

Mateja Troha

**Dijagnostička vrijednost tumorskog biljega
HE4 u diferencijalnoj dijagnostici
ginekoloških oboljenja**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2015.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Specijalna područja kliničke biokemije Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko – biokemijskog fakulteta i izrađen u Kliničkoj jedinici za specijalnu biokemiju Kliničkog zavodu za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Zagreb pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Dunje Rogić i suvoditeljstvom dr. sc. Danice Matišić i Dragane Šegulje, mag. med. biochem.

Zahvaljujem se mentorici izv. prof. dr. sc. Dunji Rogić i suvoditeljicama dr. sc. Danici Matišić i Dragani Šegulja, mag. med. biochem. na strpljenju i savjetima te osoblju Kliničke jedinice za specijalnu biokemiju Kliničkog zavodu za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Zagreb i svima ostalima koji su doprinijeli izradi ovoga rada.

Hvala roditeljima Ankici i Antunu, braći Damjanu i Josipu, rodbini, prijateljima koji su olakšali moje studiranje.

Popis kratica:

AFP = *α 1 -fetoprotein*

AUC = *engl. area under curve = površina ispod krivulje*

CA125 = *engl. carbohydrate antigen = ugljikohidratni antigen CA125 ili karcinomski antigen*

CEA = *karcinoembrionalni antigen*

ECLIA = *engl. electrochemiluminescence immunoassay = imunokemijska metoda elektrokemiluminiscencije*

EOC = *engl. epithelial ovarian cancer = epitelni karcinom jajnika*

FDA = *engl. Food and Drug Administration*

FIGO = *engl. International Federation of Gynecology and Obstetrics*

GV = *granična vrijednost*

HE4 = *engl. Human epididymal protein 4 = Ljudski epididimalni protein 4*

HKMB = *Hrvatska komora medicinskih biokemičara*

KOPB = *kronična opstruktivna plućna bolest*

KZLD = *Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku*

LN = *lažno negativni*

LP = *lažno pozitivni*

NACB = *engl. National Academy of Clinical Biochemistry*

NIH = *engl. the National Institute of Health*

p = *granica statističke značajnosti*

RMI = *engl. risk of malignancy index*

ROC = *engl. Receiver operating characteristic*

ROMA = *engl. risk of ovarian malignancy algorithm*

Ru = *rutenij*

SI = *symptom indeks*

SN = *stvarno negativni*

SP = *stvarno pozitivni*

TB = *tumorski biljeg*

TPA = *tripropilamin*

UZV = *ultrazvuk*

WAP = *engl. whey acid protein domains*

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. TUMOR.....	2
1.2. TUMORSKI BILJEZI	3
1.3. PODJELA TUMORSKIH BILJEGA	4
1.4. FAKTORI KOJI UTJEČU NA KONCENTRACIJU, OSJETLJIVOST I SPECIFIČNOST TUMORSKIH BILJEGA.....	6
1.5. TUMORSKI BILJEZI U GINEKOLOŠKOJ ONKOLOGIJI	7
1.5.1. CA125	7
1.5.2. KLINIČKA PRIMJENA CA125	9
1.5.3. HE4.....	10
1.5.4. KLINIČKA PRIMJENA HE4:.....	11
1.6. MATEMATIČKI ALGORITMI ZA PREDVIĐANJE POJAVE KARCINOMA ...	12
1.7. BOLESTI KOD KOJIH SE ODREĐUJU CA125 I HE4:	13
1.7.1. KARCINOM JAJNIKA:	13
1.7.2. VAŽNOST TUMORSKIH BILJEGA U RANOJ DIJAGNOSTICI KARCINOMA JAJNIKA	16
1.7.3. KARCINOM CERVIKSA	16
1.7.4. ENDOMETRIOZA	16
1.8. STATISTIKA	17
1.8.1. INTERKVARTILNI RASPON I GRANIČNA VRIJEDNOST	17
1.8.2. DIJAGNOSTIČKA OSJETLJIVOST I SPECIFIČNOST	18
1.8.3. ROC KRIVULJA	19
2. OBRAZLOŽENJE TEME	20
3. MATERIJALI I METODE	22
3.1.1. PREDANALITIKA: SKUPLJANJE UZORAKA I PRIPREMA.....	24

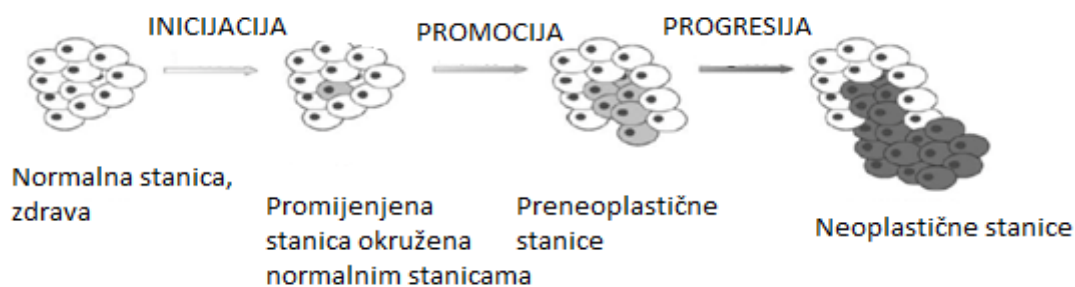
3.1.2.	ANALITIKA:.....	24
3.1.3.	STABILNOST ANALITA U UZORKU	24
3.2.	METODA:.....	25
3.2.1.	PRIMJENA METODE:.....	27
3.2.2.	MJERNA SLJEDIVOST:	28
3.2.3.	INTERFERENCIJE:	28
3.2.4.	MJERNO PODRUČJE ZA HE4:.....	28
3.2.5.	MJERNO PODRUČJE ZA CA125:.....	29
4.	REZULTATI I RASPRAVA.....	30
4.1.	REZULTATI	31
4.2.	RASPRAVA.....	38
5.	ZAKLJUČAK.....	40
6.	LITERATURA	42
7.	SAŽETAK	46
8.	SUMMARY	48

1. UVOD

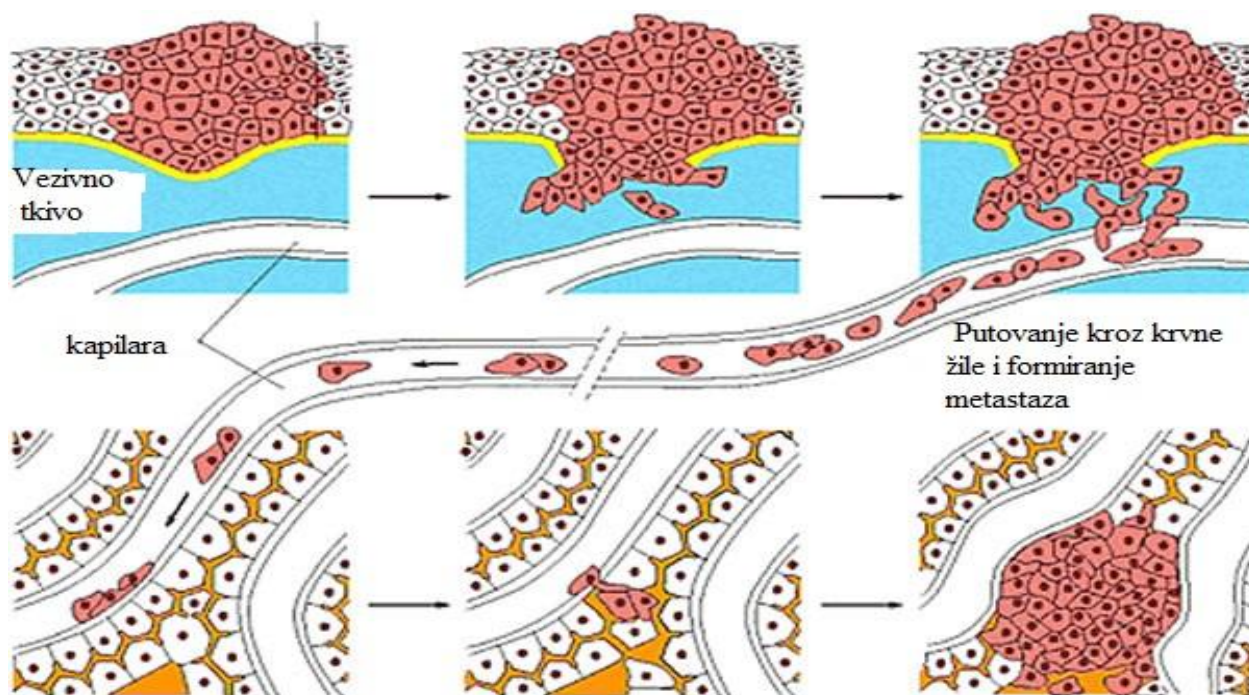
1.1. TUMOR

Zloćudne bolesti drugi su uzrok smrtnosti u većini zapadnih zemalja, odmah nakon kardiovaskularnih bolesti. Prema podacima Hrvatskoga zdravstveno-statističkog ljetopisa, i u Republici Hrvatskoj su bolesti cirkulacijskog sustava (50,26%) najčešći uzrok smrti, dok novotvorine na toj ljestvici zauzimaju drugo mjesto (24,68%). Tumor je izraslina koja može biti benigna ili maligna. (Čvorišćec i Čepelak, ured., 2009; Roche Diagnostics, 2013b)

Rak je zajednički pojam za sve zloćudne tumore, a oni se mogu podijeliti na karcinome, sarkome i hematoblastome. Karcinomi su zloćudni tumori epitelnih i mukoidnih stanica te parenhimatoznih organa (jetre, bubrega, pluća). Sarkomi su zloćudni tumori vezivnog i potpornog tkiva, a hematoblastomi zloćudni tumori hematopoetičkoga tkiva. Zloćudni se tumor razvija u četiri stadija: inicijacija, promocija i progresija te metastaziranje. Inicijacija je ireverzibilan proces u kojem se od jedne zloćudno preobražene stanice razvija klon takvih stanica. Promocija je reverzibilan proces koji ovisi o djelovanju karcinogenih čimbenika i o njihovoj količini. Progresija je ireverzibilan proces kojeg karakteriziraju uočljive genomske promjene i stvaranje primarnog, lokalnog tumora. Četvrti stadij, metastaziranje, odnosi se na širenje zloćudnih stanica u okolno tkivo. (Slike 1 i 2) (Čvorišćec i Čepelak, ured., 2009; www.klinkemija.kbcsm.hr)



Slika 1. Stupnjevi nastanka tumora (slika preuzeta i preoblikovana s is.muni.cz)



Slika 2. Metastaziranje (slika preuzeta i preoblikovana s www.zdravlje.eu)

1.2. TUMORSKI BILJEZI

Tumorski biljezi su makromolekule čije povećanje koncentracije upućuje na vjerojatnost prisutnosti zloćudnoga tumora. Mnogi su tumorski biljezi produkti zloćudnih stanica, ali ipak nisu strogo specifični za karcinom jer se većina njih sintetizira i otpušta iz normalnih stanica, tkiva ili organa te su tako utvrđene njihove granične vrijednosti, a mogu se pojaviti i kod nekih dobroćudnih bolesti. (Čvorišćec i Čepelak, ured., 2009)

Različite benigne bolesti koje utječu na tkiva koja proizvode TB mogu povećati koncentraciju TB u serumu i tako dati lažno pozitivne rezultate (Molina i sur., 2011).

S obzirom da ne postoji idealni tumorski biljeg sa 100% -tnom kliničkom (dijagnostičkom) specifičnošću i 100%-tnom osjetljivošću, postavljeni su kriteriji kojima treba udovoljiti određeni tumorski biljeg da bi bio od koristi u kliničkoj praksi. To su 95%-tna specifičnost, najmanje 50%-tna osjetljivost i korelacija s tumorskom masom. (Čvorišćec i Čepelak, ured., 2009)

Određivanje koncentracije tumorskih biljega u serumu nema značenje u ranoj dijagnostici, već služi za praćenje i procjenu prognoze bolesti (Čepelak i sur., 2004).

1.3. PODJELA TUMORSKIH BILJEGA

Tumorski biljezi su vrlo brojni, s različitim funkcijama u organizmu. Podjela TB nije jednostavna te postoje različiti sistemi kako su podijeljeni prema njihovoj građi, nastanku, fizikalno-kemijskim svojstvima, ulogama. (Molina i sur., 2011)

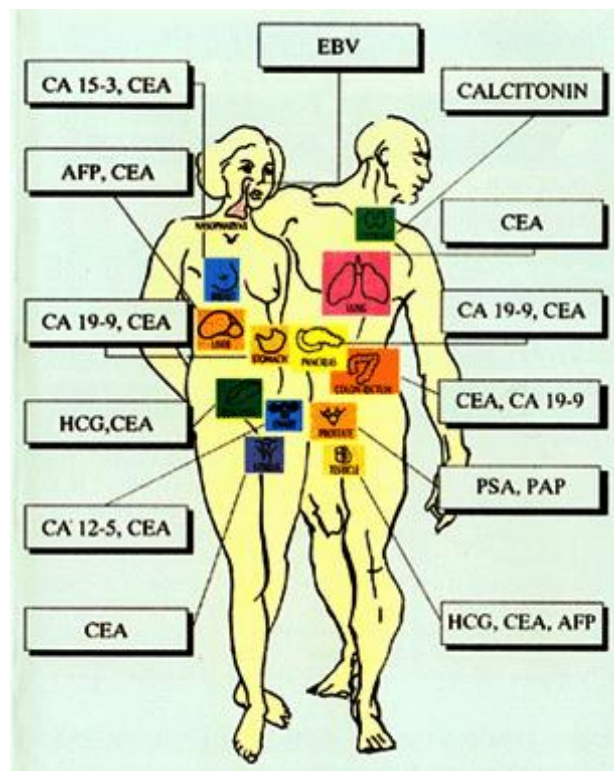
Tablica 1. Podjela TB prema strukturi (prema Čvorišćec i Čepelak, ured., 2009)

onkofetalni proteini (antigeni)	CEA, AFP, SCC
enzimi	PSA, NSE, PAP
hormoni	Kalcitonin, ACTH, ADH, HCG, PTH
ugljikohidratni epitopi koje prepoznaju monoklonska antitijela	CA125, CA15-3, CA 19-9
receptori	ER, PR
onkogeni	ras, c-myc, HER2, bcl-2, abl
tumor-supresorski geni	RB gen, p53 gen, BRCA1, BRCA2

Praktičnije ih je razvrstati prema kliničkoj upotrebi, osjetljivosti ili specifičnosti. Prema osjetljivosti i specifičnosti, tumorske biljege možemo podijeliti na:

1. TB visoke osjetljivosti i visoke specifičnosti koji uvijek pokazuju prisutnost malignoga tumora. Tu spadaju β -HCG i kalcitonin. Malo povišenje β -HCG-a u žena koje nisu trudne, tj. koncentracije iznad normale upućuju na karcinom.

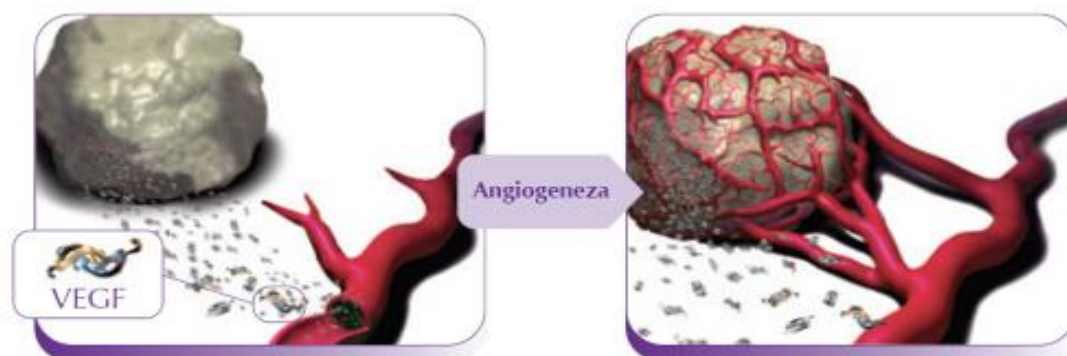
2. TB promjenjive osjetljivosti i specifičnosti. Ovo su TB s niskom osjetljivošću i specifičnošću u početnim stadijima. Njihove koncentracije u serumu su neprimjetne za zdrave osobe i pacijente s benignim bolestima dok u uznapredovalim stadijima koncentracije u serumu potvrđuju karcinom. Takvi su: CEA, PSA, CA125, CA15-3, CA19-9.
3. TB promjenjive osjetljivosti i niske specifičnosti. Ovim TB osjetljivost ovisi o stadiju bolesti, ali im je niska specifičnost čak i u napredovalim stadijima bolesti. To su citokeratini kao što je TPA (tkivni polipeptidni antigen). (Molina i sur., 2011)



Slika 3. Tumorski biljezi (slika preuzeta s www.tumori.me)

1.4. FAKTORI KOJI UTJEČU NA KONCENTRACIJU, OSJETLJIVOST I SPECIFIČNOST TUMORSKIH BILJEGA

Na koncentraciju i promjene koncentracije TB u krvi i drugim tjelesnim tekućinama utječu: ukupan broj stanica koje proizvode TB, masa tumora, širenje i stadij tumora, zatim stupanj sinteze TB, stupanj otpuštanja TB iz tumorskih stanica, vaskularizacija tumora (što je slabija opskrbljenost tumora krvlju, manje TB dospijeva u cirkulaciju), liza većih tumorskih stanica koja dovodi do povišenja TB, te poremećaji u ekskreciji, oštećenje bubrega i jetre zbog čega dolazi do porasta koncentracije TB (Lothar, 1998). Da bi tumor rastao mora uspostaviti svoju vlastitu prokrvljenost. Neke stanice luče faktor koji stimulira urastanje novih krvnih žila i infiltraciju u okolno tkivo. Benigni tumori rastu dobro ograničeni od okolnog tkiva, dok se maligni infiltriraju u zdravo tkivo, šire limfom i krvlju. (www.perpetuum-lab.com.hr)



Slika 4. Proces nastanka novih krvnih žila (slika preuzeta s www.roche.ba)

Osjetljivost i specifičnost TB ovisi o različitim faktorima. Oštećena tkiva koja proizvode TB, a nisu karcinomi, uzrokovat će nastanak lažno povišenih rezultata i povećanje koncentracije TB u serumu kao i kada je prisutan karcinom. Preživljenje bolesnika povezano je s veličinom i stadijem tumora, njegovim širenjem te faktorima koji utječu na osjetljivost TB.

TB se sintetiziraju u tumorskim stanicama, otpuštaju se iz tumora te određuju na periferiji. Dostupni su u cirkulaciji te ih određujemo iz krvi. Rastom tumora oni nadiru u krv i limfne

žile. Većina TB se razgrađuje u jetri i izlučuje bubrežima. Promjene u bilijarnoj ili urinarnoj funkciji smanjit će razgradnju i eliminaciju te tako uzrokovati nakupljanje i lažno povišene koncentracije u serumu onih TB koji se na taj način eliminiraju iz organizma. Većina TB se umjereno poveća (2-4 puta iznad granične vrijednosti) kod pacijenata s cirozom jetre ili zatajenjem bubrega : CEA, CA125. Neki TB, npr HE4, mogu dosegnuti koncentraciju u serumu, kada se radi o zatajenju bubrega, kao one koncentracije koje se javljaju kod malignih stanja. (Molina i sur., 2011)

Tumorski biljeg izbora kod ginekoloških bolesti je CA125. Zbog njegove niske osjetljivosti u početnim stadijima karcinoma jajnika, a ujedno i nedovoljne specifičnosti, proučavali su se drugi tumorski biljezi kao dodatak CA125 poput : CA 19-9, CA72-4, inhibin, citokeratini, CASA, CA15-3 ili OVX1 (Molina i sur., 2011) te mezotelin, kalikrein i osteopontin kako bi se povećala osjetljivost za ranu detekciju karcinoma jajnika (Park i sur., 2011). Njihovi doprinosi su ostali nejasni i iako se povećala osjetljivost, specifičnost je pala. Danas je TB koji obećava HE4, biljeg veće osjetljivosti nego CA125. Istraživani su različiti TB i nađena je povišena njihova koncentracija kod pacijentica s tvorbom u zdjelici i to kod onih sa karcinomom jajnika i kod onih sa benignim tvorbama. Najveću osjetljivost, uz specifičnost od 95%, imao je HE4 (72,9%) i najbolja je bila kombinacija ovoga biomarkera s CA125 (osjetljivost 76,4%). (Molina i sur., 2011; Roche Diagnostics, 2013a)

1.5. TUMORSKI BILJEZI U GINEKOLOŠKOJ ONKOLOGIJI

1.5.1. CA125

Ugljikohidratima srodni tumorski biljezi su antigeni na površini tumorskih stanica ili produkti koje luče tumorske stanice. Tu se ubrajaju visokomolekularni mucini (CA 15-3, CA 125). (Čvorišćec i Čepelak, ured., 2009)

Prvi je otkriven CA 125 1981. godine kao transmembranski glikoprotein molekularne mase veće od 200 kDa. Ugljikohidrati čine oko 24% njegove mase. CA 125 prepoznaje monoklonsko antitijelo OC 125 (razvijeno naspram stanične linije OVCA 433 pacijenta s karcinomom jajnika). (Li i sur., 2009; Burtis i sur., 2012)

Nađen je u raznim tkivima fetusa kao što su u peritoneum i pleura. U odraslih je ljudi opažen u endometriju, vratu maternice, falopijevoj tubi, pleuri i peritoneumu. Osim u serumu nalazi

se i u mlijeku, cervikalnoj sluzi, sjemenoj tekućini i amnijskoj tekućini. Granična vrijednost kod koje se optimalno razlikuju zdravi od bolesnih je 35 kIU/L. (Šamića i sur., 2006; Čvorišćec i Čepelak, ured., 2009)

Vrijednosti za CA 125 mogu biti blago povećane u nekim dobroćudnim stanjima, npr. kod jetrene ciroze, hepatitisa, endometrioze, perikarditisa, rane trudnoće, u folikularnoj fazi menstrualnog ciklusa i tijekom ovulacije. Povećane koncentracije CA 125 u serumu opažene su u bolesnika s različitim vrstama zloćudnih tumora (vrijednosti obično manje od 65 kIU/L), ali je osobito koristan biljeg za karcinom jajnika (vrijednosti obično veće od 65 kIU/L), gdje mu, uz specifičnost 95%, osjetljivost iznosi 78%. (Čvorišćec i Čepelak, ured., 2009)

CA 125 može biti povišen i kod nekih karcinoma koji nisu vezani uz jajnike kao što su karcinom endometrija, gušterače, pluća, dojke, kolorektalni karcinom te ostali GIT karcinomi (Park i sur., 2011).

CA125 je jedan od tumorskih biljega s najvećim brojem lažno pozitivnih rezultata. Oko 30,9% pacijentica imalo je koncentracije više od granične vrijednosti koje nisu povezane s malignom bolešću. Kod gotovo svih TB, bolesti jetre i bubrega su uzroci lažno povišenih rezultata. Ova povećanja su obično do 350 kIU/L, znači oko deset puta veća od granične vrijednosti. Osim navedenog, glavni uzrok lažnog povećanja CA125 je njegova prisutnost u izljevima. Molina i suradnici opisuju kako izljevi iz perikarda ili izljevi kod nefrotskoga sindroma uzrokuju niža povišenja (< 350 kIU/L) nego pleuralni izljevi (normalno < 600 kIU/L) s ascitesom. Ascites se pojavljuje i kod karcinoma jajnika. Koncentracije CA125 u serumu mogu dosegnuti do 2,000 – 3,000 kIU/L. (Molina i sur., 2011)

Tablica 2. Faktori koji utječu na koncentraciju CA125 u serumu

(preuzeto iz Ferraro i sur., 2015; Kappelmayer i sur., 2015; Molina i sur., 2011)

VIŠA KONCENTRACIJA CA125	NIŽA KONCENTRACIJA CA125	NE UTJEČU NA KONCENTRACIJU CA125
Spol (žene)	Dob (stariji od 50 godina)	Alkohol
Menstruacija	Menopauza	Pušenje
Ovulacija		fizička aktivnost prije uzorkovanja krvi
Rasa (u bjelkinja)	Rasa (u stanovnica Azije i Afrike)	

1.5.2. KLINIČKA PRIMJENA CA125

CA125 je jedini biljeg koji je do sada prihvaćen u kliničkoj primjeni kod karcinoma jajnika. NACB ne preporuča ostale biljege u dijagnostici i praćenju karcinoma jajnika. (Chan i sur., 2009)

Većina kliničkih smjernica ne preporuča CA125 za korištenje u probiru jer njegova osjetljivost i specifičnost nije dovoljno visoka za probir karcinoma jajnika u ranom stadiju. (Molina i sur., 2011; Topić i sur., 2004)

Prema NIH, CA125 se uz ultrazvuk određuje u probiru žena s pozitivnom obiteljskom anamnezom za karcinom jajnika. (Park i sur., 2011; Andersen i sur., 2010)

Probir se preporuča i u postmenopauzalnih žena, jer su povišene vrijednosti u postmenopauzi češće udružene s malignom bolešću, nego kod žena u premenopauzi (Šamija i sur., 2006) te je koncentracija CA125 često lažno povišena kod benignih bolesti kod pacijentica u premenopauzi, kao što je endometrioza, pa se koristi za detekciju EOC samo kod žena u postmenopauzi. (Bandiera i sur., 2012)

Određivanje koncentracije CA125 važno je i prije i poslije operacije. Poslije operacije i kemoterapije, smanjenje koncentracije CA125 pokazalo se kao važan prognostički faktor.

Smanjenje koncentracije CA125 tijekom terapije pokazatelj je dobre prognoze. Različite institucije, kao što su NIH i NACB, preporučuju uporabu CA125 kao prognostičkoga indikatora. Što su niže koncentracije CA125 nakon početnoga tretmana veća je vjerojatnost preživljenja. Povišena koncentracija CA125 prvi je znak recidiva karcinoma. Smanjenje koncentracije TB u serumu ukazuje na pozitivan odgovor pacijenta na terapiju. (Molina i sur., 2011)

1.5.3. HE4

HE4 otkrio je Kirchoff 1991 godine (Simmons i sur., 2013). HE4 je sekretorni protein koji pripada obitelji inhibitora proteaza (WAP) koji su uključeni u funkciju imunosnoga sustava. Gen koji kodira sintezu HE4 je WFDC2. Veličine je 13 kD, a zrela glikozilirana forma je veličine 20-25 kD. Prvo je pronađen u epididimisu, a kasnije i u respiratornom epitelu, distalnim tubulima bubrega, salivarnim žlijezdama, tireoideji, dojka, falopijevoj tubi, endometriju, cerviksu, prostati i mukozi kolona. Najviše je eksprimiran u tkivu karcinoma jajnika. (Burtis i sur., 2012; Molina i sur., 2011; Kappelmayer i sur., 2015; Park i sur., 2011)

Većinom je eksprimiran u seroznim i endometrijskim karcinomima, ali ne i kod mukoznih tumora. HE4 je manje eksprimiran i kod adenokarcinoma pluća i dojki, a još manje kod karcinoma GIT-a i urološkoga puta. Ovisno o autoru, koncentracije HE4 u serumu 100 – 150 pmol/l smatraju se graničnima. Zatajenje bubrega glavni je uzrok lažno pozitivnih rezultata HE4, kada su koncentracije deset puta veće od granične vrijednosti. (Molina i sur., 2011)

HE4 je biljeg veće specifičnosti nego CA125. Kada se HE4 kombinirao s CA125 osjetljivost je bila viša, nego osjetljivost HE4 samoga. (Lin i sur., 2013)

Tablica 3. Faktori koji utječu na koncentraciju HE4 u serumu

(preuzeto iz Ferraro i sur., 2015; Kappelmayr i sur., 2015; Simmons i sur., 2013)

VIŠA KONCENTRACIJA HE4	NIŽA KONCENTRACIJA HE4	NE UTJEČU NA KONCENTRACIJU HE4
Pušenje (za 20-30% više vrijednosti HE4 u epitelu bronha)	Što je veći BMI (indeks tjelesne mase)	Cirkadijalni ritam
Maligne bolesti	U premenopauzi (u odnosu na postmenopauzu)	Alkohol
Kronična bubrežna bolest, bolesti jetre	Trudnoća	Fizička aktivnost
Spol (u Ž za 7-9% više konc nego u M)	U folikularnoj fazi nego u ovulaciji (menstruacijski ciklus)	Korištenje hormona, kontraceptiva (estrogena i progestina)
Dob (koncentracija HE4 postupno raste s dobi)		Korištenje lijekova u kemoterapiji
Tuberkuloza, endometrioza (dobroćudne bolesti zdjelice i pluća)		Endometrioza

1.5.4. KLINIČKA PRIMJENA HE4:

mRNA koja kodira za sintezu HE4 nalazi se u epitelnim stanicama epididimisa. Moguća uloga HE4 je da se koristi u sazrijevanju spermija. (Simmons i sur., 2013)

HE4 značajan je kao biljeg za detekciju i praćenje karcinoma jajnika, posebice u kombinaciji s CA125, što je sadašnji zlatni standard za karcinom jajnika. HE4 je bolji od CA125 kao biomarker za karcinom jajnika posebice u razlikovanju benignih bolesti od malignih. (Moore i sur., 2012; Li i sur., 2009)

Korištenjem oba biljega, uspješno su klasificirane žene s masom u zdjelici koje imaju visok ili nizak rizik od pojave epitelnoga karcinoma jajnika. HE4 je koristan i kao biljeg karcinoma endometrija. (Burtis i sur., 2012)

Jako je izražen u pacijenata s karcinomom endometrija i osjetljiviji je od CA 125 i u ranom i u kasnom stadiju. Značajan je u razlikovanju endometrioze od karcinoma jajnika i karcinoma endometrija. Koncentracija HE4 najviša je u ovim bolestima nego ijedan drugi biljeg koji je istraživao. (Kappelmayer i sur., 2015)

1.6. MATEMATIČKI ALGORITMI ZA PREDVIĐANJE POJAVE KARCINOMA

Za predviđanje pojave karcinoma koriste se matematički algoritmi u kojima se koriste koncentracije CA125 i HE4 kako bi se bolje pratili pacijenti kod kojih se sumnja da imaju ginekološke malignosti. Prvi uvedeni algoritam je RMI. Dobiven je kombiniranjem vrijednosti CA125, ultrazvuka i menopauzalnoga statusa. SI je ustanovljen prema pacijentovom doživljaju boli u zdjelici i abdomenu te vrijednosti CA125. (Simmons i sur., 2013; Andersen i sur., 2010)

Prema ROMA rezultatu procjenjuje se rizik postojanja EOC kod žena s prisutnom tvorbom u zdjelici. Računanje ROMA indeksa uključuje koncentracije HE4 i CA125 i podrazumijeva menopauzalno stanje žene (pre ili post-menopauza). Odobrena je od FDA za razlikovanje malignih od benignih tvorbi zdjelice. (Simmons i sur., 2013).

Ustanovljeno je da je ROMA indeks bolji od RMI u procjeni rizika za EOC. Korištenjem oba biljega mogu se žene podijeliti u skupine s visokim i niskim rizikom. Ukoliko je ROMA u premenopauzi $< 11.1\%$, a u postmenopauzi $< 29.9\%$ rizik za prisutnost karcinoma jajnika je nizak. Ukoliko je ROMA $\geq 11.4\%$ u premenopauzi, a $\geq 29.9\%$ u postmenopauzi postoji visok rizik za prisutnost karcinoma jajnika. (Roche Diagnostics, 2013b)

1.7. BOLESTI KOD KOJIH SE ODREĐUJU CA125 I HE4:

1.7.1. KARCINOM JAJNIKA:

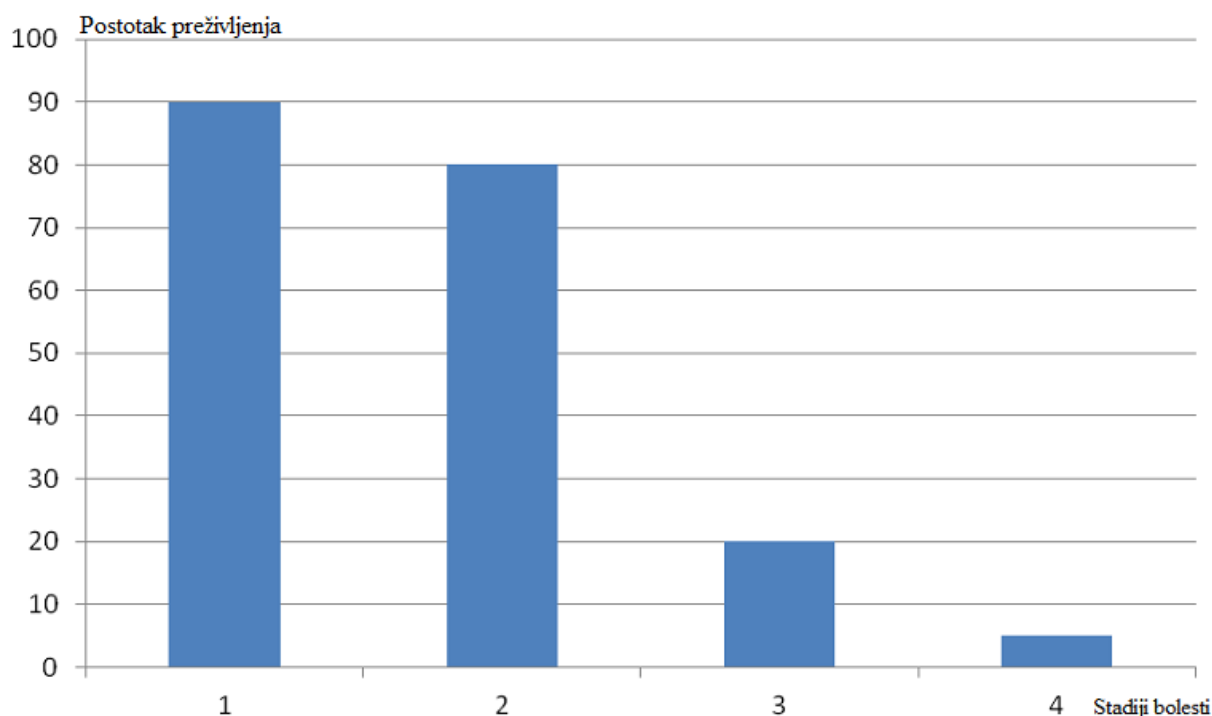
Karcinom jajnika drugi je po zastupljenosti u žena i ujedno vodeći uzrok smrti među ginekološkim karcinomima s učestalošću od 80% te je izlječiv ako se rano dijagnosticira (Kappelmayer i sur., 2015; Vrdoljak i sur., 2013).

Najčešće se dijagnosticira oko 60-te godine života, a bolest je tada u 70 % oboljelih već uznapredovala. Godišnje se u svijetu pojavi oko 200 000 slučajeva od čega umre 140 000 pacijentica. (70 %). Incidencija raka jajnika u Hrvatskoj godine 2008. iznosila je 465/100 000 žena, a mortalitet 326/100 000 žena (70 %) (Vrdoljak i sur., 2013).

Stupanj preživljenja ovisi o stadiju bolesti. Stupanj preživljenja je 70-90% u početnim stadijima, a 11-20 % u stadiju IV. (Molina i sur., 2011)

Prema International Agency for Research on Cancer preživljenje pacijentica s karcinomom jajnika u 5 godina je 46%. Ukoliko se bolest rano dijagnosticira, preživljenje je čak 94 %. (Roche Diagnostics, 2013a)

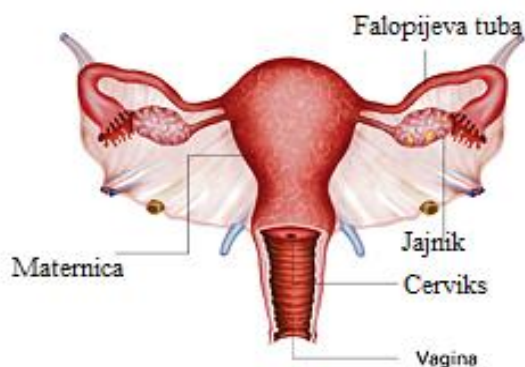
U 75% pacijentica s EOC simptomi se javljaju tek u kasnijim stadijima (stadiji 3 i 4). Dakle, < 30% karcinoma jajnika se detektira u stadijima 1 i 2. (Roche Diagnostics, 2013b)



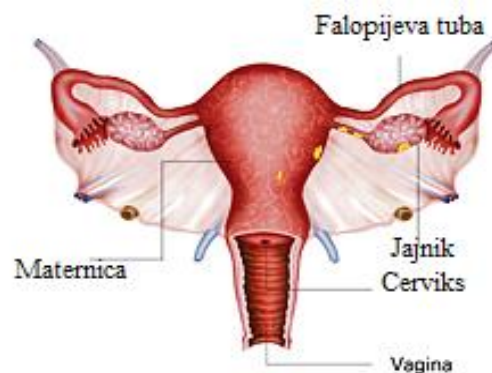
Slika 5. Petogodišnji stupanj preživljenja karcinoma jajnika ovisno o stadiju prema FIGO klasifikaciji (preuzeto i prepravljeno iz Roche Diagnostics, 2013b)

Razlog kasne dijagnoze bolesti (tek u III i IV stadiju) jest činjenica da su simptomi raka jajnika nespecifični i da se kasno pojavljuju. Najčešći simptomi su: nelagodnost u trbuhu, povećanje opsega trbuha, bol, vaginalno krvarenje. Kasniji simptomi su opća slabost, anemija. (Vrdoljak i sur., 2013)

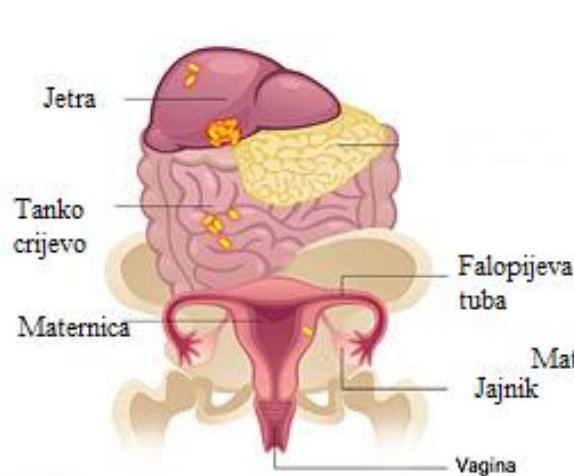
Dijagnostika: ginekološki pregled, ultrazvučni pregled, određivanje koncentracije CA 125, citološki nalaz abdominalnog ili pleuralnog izljeva. Liječi se kirurškim zahvatom i kemoterapijom. Praćenje terapije vrši se kontrolom tumorskog biljega CA 125. Pozitivan odgovor na liječenje je smanjenje biljega CA 125 ili CT-om viđeno smanjenje tumora. Tada se nastavlja s primjenom istog protokola kemoterapije. U suprotnom se terapija mijenja. (Vrdoljak i sur., 2013)



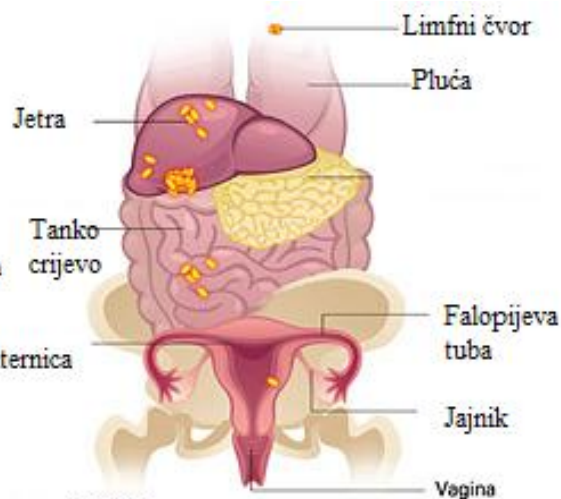
Stadij 1:
Tumor je ograničen na jedan ili na oba jajnika.



Stadij 2:
Tumor je u jednom ili oba jajnika, sa širenjem u zdjelicu, ali bez širenja u abdomen.



Stadij 3:
Tumor se širi izvan zdjelice, u abdominalne organe



Stadij 4:
Metastaze se šire na pluća i limfne čvorove u vratu

Slika 6. Četiri stadija karcinoma jajnika (slike preuzete i prepravljene s www.kkh.com.sg)

1.7.2. VAŽNOST TUMORSKIH BILJEGA U RANOJ DIJAGNOSTICI KARCINOMA JAJNIKA

Tumorski biljeg izbora je CA125. Njegova osjetljivost je povezana sa stadijima bolesti (I 50-70 %, II 70-90 %,III i IV > 90 %) i s histološkim tipom (maksimalna osjetljivost je kod seroznih karcinoma). (Molina i sur., 2011)

U dijagnostici karcinoma jajnika u ranom stadiju, kada CA 125 sam nije značajan, doprinosi HE4. Kao pojedinačan tumorski biljeg, HE4 ima veću osjetljivost za detekciju karcinoma jajnika, posebice stadija 1 bolesti, koji je bez simptoma. Kombinacija HE4 i CA 125 puno je osjetljivija u dijagnostici EOC nego ijedan biljeg sam. Kombinacijom CA 125 i HE4 veća je osjetljivost, 76,4 % , uz specifičnost 95 % . (Roche Diagnostics, 2013a)

1.7.3. KARCINOM CERVIKSA

Treći je uzrok smrti od karcinoma u žena (Molina i sur., 2011).

Pojavljuje se uglavnom u sredinama slabijega socijalno-ekonomskog statusa,te u mlađoj životnoj dobi (ne u razvijenim zemljama jer je u njima bolja dostupnost zdravstvene zaštite). Metoda koja se koristi za ranu detekciju je PAPA –test. (Vrdoljak i sur., 2013)

1.7.4. ENDOMETRIOZA

Endometrioza je prisutstvo tkiva endometrija na ektopičnim mjestima u zdjelici (izvan zdjelice, tj maternice). Tkivo endometrija može penetrirati u miometrij, jajnik, cerviks, vaginu i uterine tube. U ektopičnom tkivu endometrija zbivaju se iste promjene kao i u endometriju maternice, kao što je menstruacijsko krvarenje koje može biti uzrok jake boli u zdjelici i dismenoreje (bolnog menstruacijskog krvarenja). Ektopično tkivo potrebno je kirurški odstraniti. (Kujundžić i sur., 2003)

1.8. STATISTIKA

1.8.1. INTERKVARTILNI RASPON I GRANIČNA VRIJEDNOST

Mjere rasapa podataka opisuju na koji su način podaci raspršeni, odnosno koliko prosječno odstupaju od neke srednje vrijednosti. Mjere rasapa podataka su raspon, standardna devijacija i koeficijent varijacije. Za podatke koji ne slijede normalnu raspodjelu, najčešće mjere rasapa su raspon između najveće i najmanje vrijednosti te interkvartilni raspon. Ukoliko se raspodjela podataka podijeli na 4 jednaka dijela, takvi dijelovi nazivaju se kvartili. Najčešće upotrebljavani su 1. i 3. kvartil koji tvore interkvartilni raspon. Interkvartilni raspon daje informaciju o većini podataka i zanemaruje ekstremne vrijednosti na krajevima krivulje.

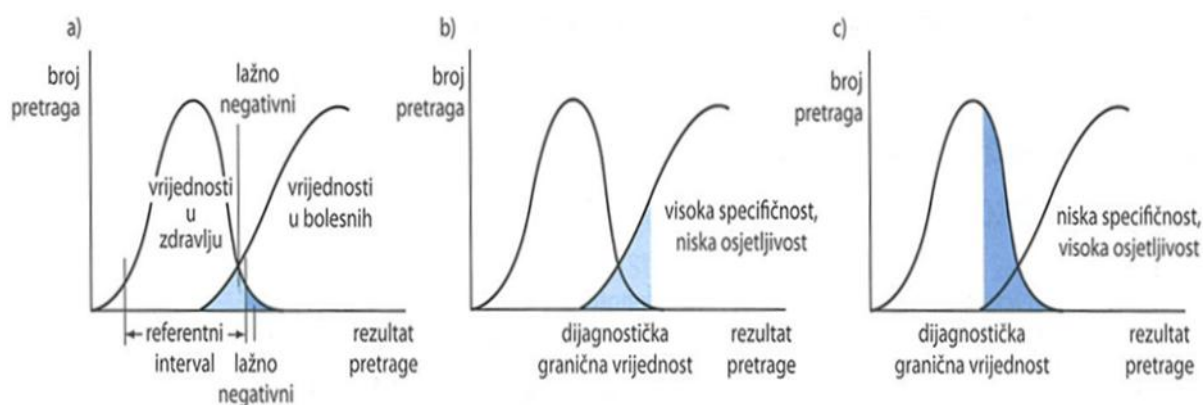
Dijagnostička točnost nekog dijagnostičkog postupka ili pretrage daje nam odgovor na pitanje koliko dobro taj test razlikuje neka dva stanja od interesa (npr. zdravlje i bolest). Ona se može izraziti mjerama dijagnostičke točnosti kao što su osjetljivost i specifičnost, površina ispod krivulje ROC.

U idealnom slučaju, dijagnostički bi postupak bio onaj za kojega vrijedi da granična vrijednost (engl. *cut-off*) u potpunosti razgraničuje populaciju zdravih i bolesnih osoba te da su vrijednosti iznad granične uvijek znak bolesti, dok snižene vrijednosti nalazimo isključivo u zdravih. Vrijednosti iznad granične nisu uvijek znak bolesti, već i neki zdravi ispitanici imaju povišene vrijednosti koje onda nazivamo lažno pozitivnim vrijednostima. Snižene vrijednosti nalazimo pretežito u zdravih osoba, ali istovremeno i neki bolesnici mogu imati snižene vrijednosti koje su zapravo lažno snižene, tzv. lažno negativne. Dakle, granična vrijednost dijeli ispitivane populacije zdravih i bolesnih na četiri podskupine. Stvarno i lažno pozitivne pacijente te stvarno i lažno negativne pacijente. (Šimundić, 2008)

1.8.2. DIJAGNOSTIČKA OSJETLJIVOST I SPECIFIČNOST

Osjetljivost i specifičnost se izražavaju postotkom. Osjetljivost definira udio stvarno pozitivnih bolesnika u ukupnoj skupini bolesnika ($SP / SP + LN$). Dakle, osjetljivost je vjerojatnost da ćemo dobiti pozitivan rezultat nekog testa u bolesnika. Radi se o sposobnosti pretrage da prepozna bolesnike.

Specifičnost je udio zdravih ispitanika s negativnim rezultatom pretrage (tj. stvarno negativni) u ukupnom broju zdravih ispitanika ($SN / SN + LP$). Dakle, specifičnost predstavlja vjerojatnost da ćemo u zdrave osobe dobiti negativan rezultat. Radi se o sposobnosti pretrage da prepozna zdrave osobe. (Šimundić, 2008)



Slika 7. Koncept preklapanja vrijednosti (preuzeto iz Čvorišćec i Čepelak, ured., 2009)

1.8.3. ROC KRIVULJA

Budući da osjetljivost i specifičnost nekog testa nisu konstantne mjere dijagnostičke točnosti nego se mijenjaju s izborom granične vrijednosti, za svaku pojedinu graničnu vrijednost postoji par dijagnostičke osjetljivosti i specifičnosti. Nanošenjem tih parova vrijednosti na graf kojemu su osi: apscisa = $1 - \text{specifičnost}$ i ordinata = osjetljivost, nastaje krivulja ROC.

Po obliku krivulje ROC i površini ispod nje (AUC) možemo procijeniti kolika je učinkovitost pretrage, tj. njena dijagnostička točnost. Što je krivulja bliže gornjem lijevom kutu grafa, a njena površina veća, to je dijagnostička točnost ispitivane pretrage veća. Površina ispod krivulje može zauzeti bilo koju vrijednost između 0 i 1. Općenito govoreći možemo reći da za odnos površine ispod krivulje i dijagnostičke točnosti vrijedi kako je navedeno u tablici 6. AUC je globalna mjera dijagnostičke točnosti. Ona nam ne govori ništa o pojedinim mjerama kao što su osjetljivost, specifičnost već nam služi za općenitu procjenu i za međusobnu usporedbu dvaju ili više dijagnostičkih testova. Usporedbom površina ispod krivulja možemo procijeniti koji od neka dva testa je bolji u razlikovanju zdravlja i bolesti.

Usporedbu površina ispod krivulja ROC nije dozvoljeno temeljiti na vizualnoj procjeni, nego nam u tu svrhu služe statistički testovi kojima procjenjujemo značajnost razlike između dvije AUC, uz prethodno izabranu granicu statističke značajnosti (P). (Šimundić, 2008)

Tablica 4. Odnos površine ispod ROC krivulje i dijagnostičke točnosti (preuzeto iz Šimundić, 2008)

POVRŠINA	DIJAGNOSTIČKA TOČNOST
0,9 – 1,0	izvrsna
0,8 – 0,9	vrlo dobra
0,7 – 0,8	dobra
0,6 – 0,7	dovoljna
0,5 – 0,6	loša
< 0,5	nedovoljna

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Cilj ovoga rada bio je ispitati dijagnostičku vrijednost novoga tumorskog biljega HE4 kod bolesnica upućenih na određivanje CA125 u Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Zanima nas razlikuje li HE4 bolje nego CA125 zdrave od bolesnih osoba.

Kako je CA125 jedan od tumorskih biljega s najvećim brojem lažno pozitivnih rezultata te mu je slaba dijagnostička točnost, istraživani su i drugi TB. Jedini od istraživanih značajan je bio HE4 pa smo i mi željeli ispitati i potvrditi je li njegova dijagnostička osjetljivost i specifičnost u skladu s literaturnim podacima te kakva je u odnosu na TB koji sada koristimo u kliničkoj praksi, a to je CA125.

3. MATERIJALI I METODE

3.1.MATERIJALI:

Na automatiziranom sustavu reagensi se umjeravaju postupkom kalibracije, a preciznost i točnost sustava provjerava se kontrolnim uzorcima u dvije razine (normalnoj i patološkoj).

kalibrator = HE4 CalSet i CA125 II CalSet, spremni za upotrebu

kontrolni uzorci za HE4: PreciControl HE4 1 - 2 bočice, u svakoj 1,0 ml kontrolnog seruma

PreciControl HE4 2 - 2 bočice, u svakoj 1,0 ml kontrolnog seruma

kontrolni uzorci za CA125: PreciControl Tumor Marker 1 – 2 bočice, u svakoj 3,0 ml

kontrolnoga seruma

PreciControl Tumor Marker 2 - 2 bočice, u svakoj 3,0 ml

kontrolnoga seruma

(PreciControl = liofilizirani kontrolni serum baziran na ljudskom serumu)

otopina za razrjeđivanje (kod HE4) = Diluent MultiAssay

otopina za razrjeđivanje (kod CA125) = Diluent Universal

analizator cobas e 601

reagensi (radne otopine)

Pakiranje reagensa obilježeno je s HE4 ili s CA125, ovisno o biljegu koji se određuje sadrži:

M = streptavidinom prekrivene mikročestice

R1 = anti HE4 At obilježeno biotinom (monoklonoalno At iz miša) i fosfatni pufer pH = 6,5
ili anti CA125 At obilježeno biotinom (monoklonoalno, iz miša) i fosfatni pufer pH=7,4

R2 = anti HE4 At obilježeno rutenij kompleksom (monoklonoalno At iz miša) i fosfatni
pufer pH = 7,4 ili anti CA125 At obilježeno rutenij kompleksom i fosfatni pufer pH=7,4

3.1.1. PREDANALITIKA: SKUPLJANJE UZORAKA I PRIPREMA

Za analizu se koristio serum dobiven vađenjem krvi u standardne epruvete ili epruvete koje sadrže gel separator (odvaja stanice od seruma, serum je gore, a stanice ispod gela). Primarni uzorak se stavlja na uređaj za predanalitičku obradu gdje se centrifugira (30 min nakon uzimanja krvi, 10 min na 3500 okr/min (www.hkmb.hr)), odčepljuje, alikvotira 200 µL u novu epruvetu na koju se lijepi crtični kod. Alikvoti se razvrstavaju na radna mjesta, ovisno o zadanoj pretrazi.

Kontrole uzorke potrebno je otopiti u 5,0 mL destilirane ili deionizirane vode čija je temperatura 15-25 °C. Zatim začepiti i ostaviti stajati na sobnoj temperaturi najmanje 30 minuta uz povremeno miješanje. Prije određivanja lagano promiješati uzorak kružnim okretajima nekoliko puta da se osigura homogenost uzorka. Inverzno, snažno miješanje nije dozvoljeno.

Kontrole se puštaju prije serije uzoraka. S kontrolnim serumima se postupa kao s uzorcima pacijenata.

3.1.2. ANALITIKA:

Koncentracije tumorskih biljega CA125 i HE4 određivane su na imunokemijskom analizatoru Cobas 6000cee (ECLIA, Roche Diagnostics). Svako slovo kratice cee označava dio modularnog sustava analizatora. Prvo slovo, c označava da se kolorimetrijski/turbidimetrijski određuju na ovom imunokemijskom analizatoru specifični proteini (albumin, imunoglobulini, transferin, haptoglobin,...), drugo i treće slovo e označava metodu ECLIA ili elektrokemiluminiscencija koja se koristi za određivanje tumorskih biljega te vitamina i hormona.

3.1.3. STABILNOST ANALITA U UZORKU

CA125: 5 dana na temperaturi 2-8 °C ili 3 mjeseca na -20 °C (Roche Diagnostics, 2011).

HE4: 48 sati na 2-8 °C, 5 sati na 15-25 °C ili 12 tjedana na -20 °C (Roche Diagnostics, 2013a).

Jednom otopljen zamrznuti uzorak više nije moguće zamrzavati.

3.2. METODA:

Korištena metoda je ECLIA. Princip metode je sendvič imunokemijska metoda. Ukupno trajanje analize je 18 minuta.

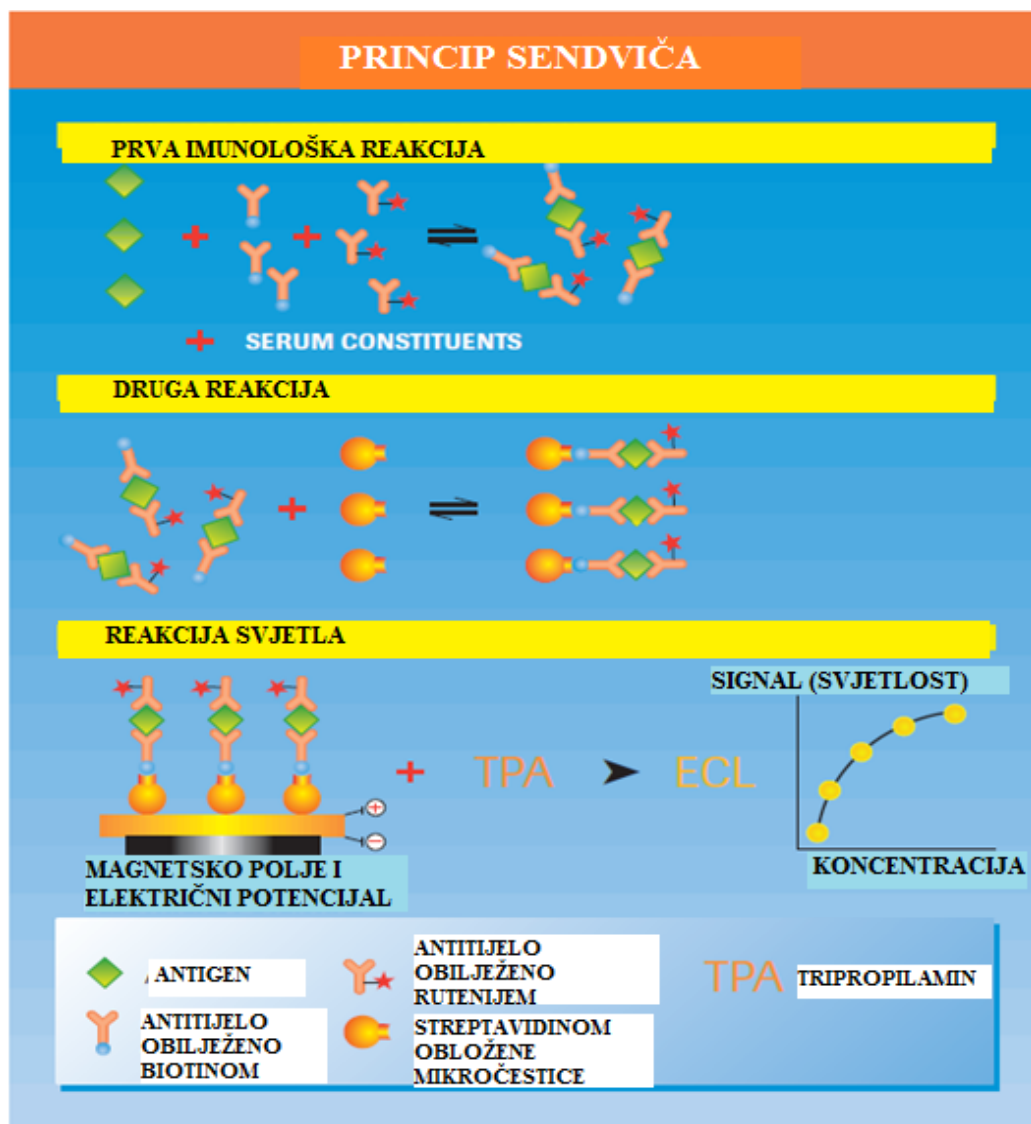
Prva inkubacija: 20 µL CA125 ili 10 µL HE4 uzorka inkubira se s biotinom obilježenim monoklonalnim At specifičnim za određivani biljeg (CA125 ili HE4) i monoklonalnim CA 125 (HE4)-specifičnim At obilježenim rutenijevim kompleksom. Oni tvore sendvič At (obilježeno biotinom) - antigen (CA-125 ili HE4) - At (obilježeno kompleksom rutenija).

Druga inkubacija: Nakon dodatka mikročestica obilježenih sa streptavidinom, kompleks se veže za stacionarnu fazu streptavidinom koji je vezan za biotin kojim je obilježeno antitijelo.

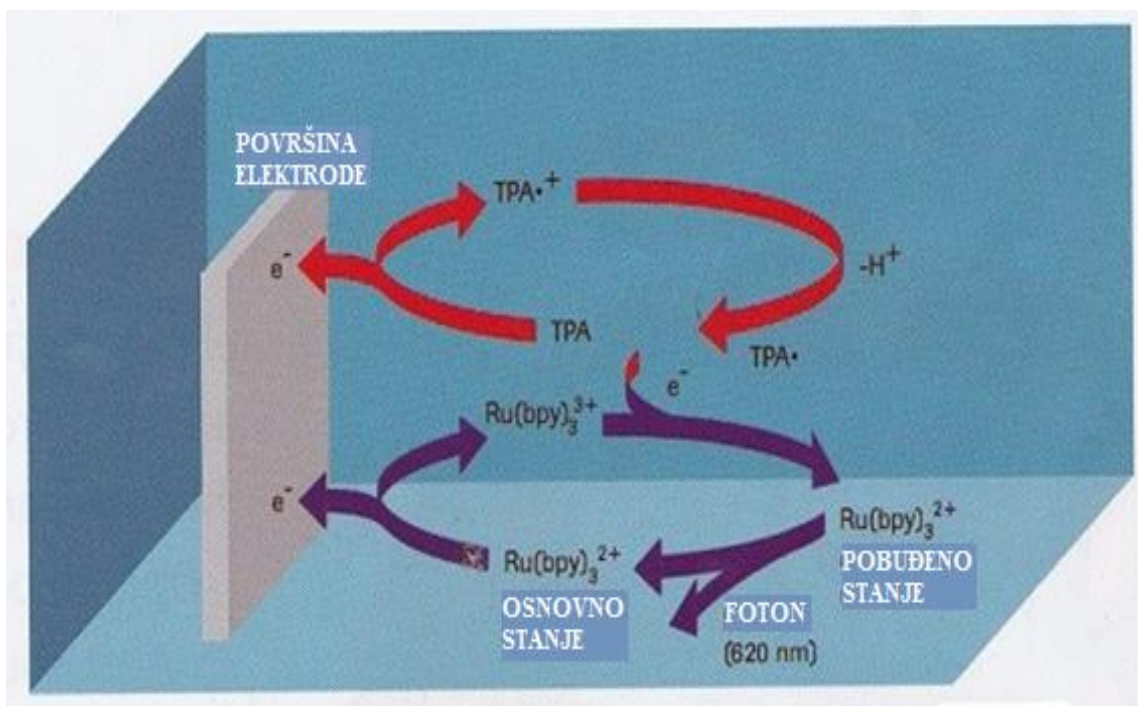
Reakcijska smjesa se usiše u mjernu komoru (cijev za mjerenje), gdje se mikročestice vežu na magnet, odnosno površinu elektrode. Nevezane supstance se onda uklone pomoću otopine ProCell/ProCell M koja sadrži TPA. Nakon primjene napona na elektrodu, nastaje kemiluminiscentna reakcija između TPA i Ru-kompleksa, koja dovodi do emisije svjetla, koju mjeri fotomultiplikator. Nastala količina svjetla proporcionalna je koncentraciji analita u uzorku.

kompleks rutenija : $(\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}) = \text{Tris}(2,2'\text{-bipiridil})\text{rutenij(II)kompleks}$

(Roche Diagnostics, 2013a).



Slika 8. Princip metode (ECLIA) (slika preuzeta s www.hnlab.ir)



Slika 9. Reakcija između TPA i Ru-kompleksa (slika preuzeta s www.hnlab.ir)

TPA se na elektrodi oksidira (otpušta elektron) i stvara radikal $\text{TPA}^{\bullet+}$ dok se Ru-kompleks (u kojem je Ru u Ru^{2+} obliku) oksidira do kationa (Ru^{3+}). TPA radikal i Ru-kation reagiraju pri čemu se Ru-kompleks reducira i prelazi u pobuđeno stanje. Ono je nestabilno pa dolazi do emisije fotona na 620 nm i kompleks se vraća u osnovno stanje. Reakcijski ciklus sada može ponovo početi. TPA se troši, stoga ga treba biti u suvišku. Ru-kompleks se konstantno regenerira te može proći kroz niz ciklusa, u kojima se stvara svjetlosni signal.

3.2.1. PRIMJENA METODE:

ECLIA se koristi na imunokemijskim analizatorima Elecsys i cobas e. Imunometoda je za in vitro kvantitativno određivanje HE4 i CA125 u humanom serumu i plazmi. Koristi se za praćenje povratne ili uznapredovale bolesti u pacijenata s epitelnim karcinomom jajnika. Tijekom praćenja bolesti, uz vrijednosti biljega treba pratiti i kliničku sliku. Vrijednosti biljega u uzorcima pacijenata jako se mijenjaju ovisno o metodi koja se koristi. Ne mogu se uspoređivati vrijednosti uzoraka pacijenata koji su testirani različitim metodama jer bi to

dovelo do pogrešnih interpretacija. Ako se tijekom praćenja terapije uvodi nova metoda određivanja, potrebno je vrijednosti biljega pratiti paralelno, s obje metode.

(Roche Diagnostics, 2013a)

3.2.2. MJERNA SLJEDIVOST:

Metoda određivanja HE4 je standardizirana prema HE4 EIA testu od Fujerebio Dijagnostics (metoda koja se prije koristila) (Roche Diagnostics, 2013a), a metoda određivanja CA125 sljedeća je do RIA testa od Fujerebio Dijagnostics. (Roche Diagnostics, 2011)

Analizator daje koncentraciju HE4 u svakom uzorku u pmol/L, a koncentraciju CA125 u kIU/L.

3.2.3. INTERFERENCIJE:

Nema utjecaja ikterije do koncentracije bilirubina $< 1130 \mu\text{mol/L}$, hemolize ako je koncentracija hemoglobina ($< 0,621 \text{ mmol/L}$ kod određivanja HE4, a $< 2 \text{ mmol/L}$ za određivanje CA125), lipemije ako je koncentracija lipida $< 2 \text{ mmol/L}$ te biotina ako je koncentracija ($< 205 \text{ nmol/L}$ za HE4 i $< 143 \text{ nmol/L}$ za CA125). (Roche Diagnostics, 2013a)

Kriterij prihvatljivosti: Analitičar treba osigurati da KV% bude do 5% u seriji određivanja, a između serija određivanja $< 10\%$. (Sturgeon, 2009)

3.2.4. MJERNO PODRUČJE ZA HE4:

15,0 – 1500 pmol/L

vrijednosti ispod pišu se kao $< 15 \text{ pmol/L}$

vrijednosti iznad pišu se kao $> 1500 \text{ pmol/L}$ (ili se razrijeđuju 20 puta do 30 000 pmol/L)

granična vrijednost : $\text{HE4} \leq 140 \text{ pmol/L}$

(Roche Diagnostics, 2013a)

3.2.5. MJERNO PODRUČJE ZA CA125:

0,600 – 5000 kIU/L

vrijednosti ispod pišu se kao $< 0,600$ kIU/L

vrijednosti iznad pišu se kao > 5000 kIU/L (ili se razrjeđuju 5 puta do 25 000 kIU/L)

granična vrijednost: CA125 < 35 kIU/L

(Roche Diagnostics, 2011)

4. REZULTATI I RASPRAVA

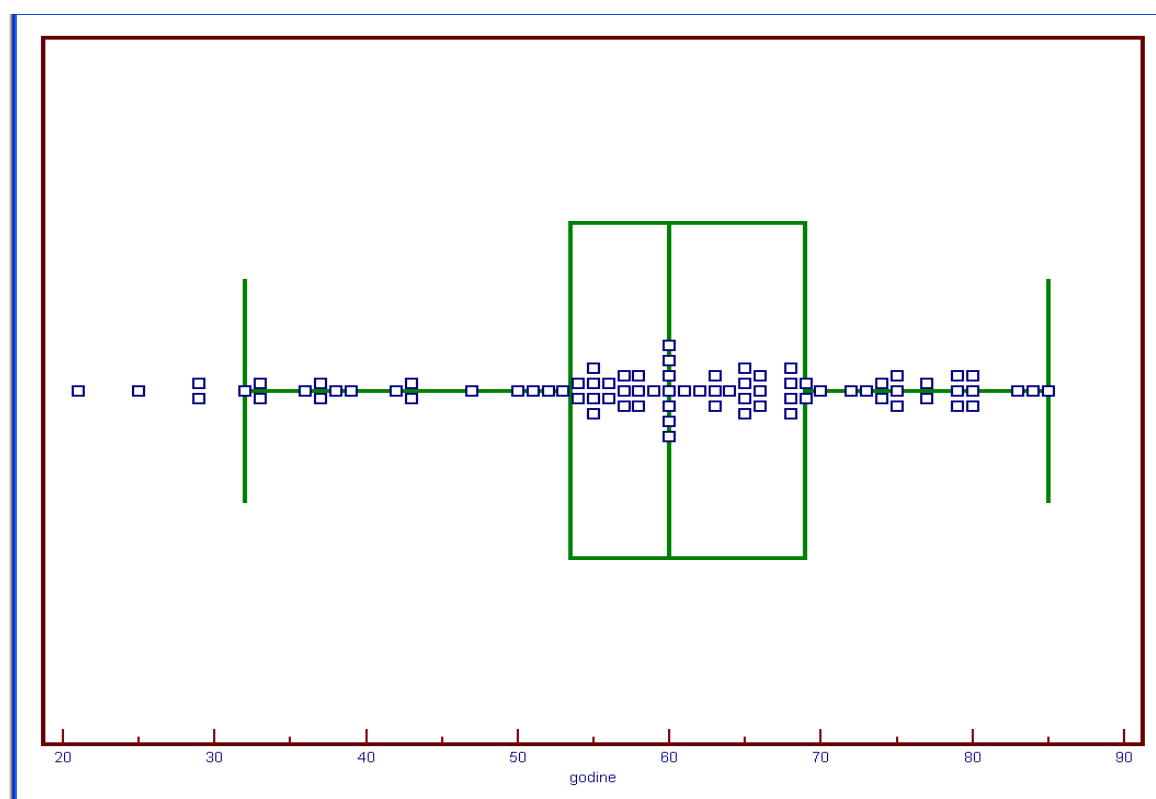
4.1. REZULTATI

Skupinu ispitanika činilo je 80 žena, starosti 21-85 godina, upućenih na određivanje CA125 u Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb.

Pacijenticama su određivane koncentracije CA125 i HE4. Dobiveni podaci mogu slijediti normalnu ili nenormalnu raspodjelu. Normalna raspodjela, koja se još naziva i Gaussova raspodjela, simetrična je te ima oblik zvona s većinom podataka smještenom u sredini krivulje. Kako podaci, koje smo mi dobili, ne slijede normalnu raspodjelu prikazali smo ih interkvartilnim rasponom koji je prikazan na slici 10 te medijanom.

Rezultati istraživanja prikazani su u tablici 5 te su podijeljeni u 2 kategorije, pacijentice s malignom bolesti te one s benignom bolešću, što je prikazano na slici 11.

U obradi naših rezultata koristili smo krivulju ROC, a prikaz na krivulji ROC, slika 12, definirali prema tablici 4.



Slika 10. Box-Whisker graf - nenormalna raspodjela podataka – interkvartilni raspon

(slika preuzeta i preoblikovana iz statističkoga programa MedCalc v9.3.2.0
(omogućio:KZLD))

Tablica 5. Rezultati

Red. br.	God.	CA125 (kIU/L)	HE4 (pmol/L)	Dijagnoza	prema dijagnozi
1	66	64,05	334,7	Npl. cervics. FIGO IIIB	1
2	65	901,2	301,7	Npl. corporis uteri FIGO IIIC1	1
3	47	20,25	44,52	Dobroćudna novotvorina jajnika	0
4	79	17,69	131,1	Npl. mammae I	1
5	63	33,72	132,1	Carcinosarcoma uteri FIGO IB	1
6	61	65,29	144,6	Zloćudna novotvorina jajnika	1
7	74	31,36	178,4	Zloćudna novotvorina jajnika	1
8	60	14,72	66,52	Folikularna cista jajnika	0
9	55	17,86	54,33	Zloćudna novotvorina jajnika	1
10	55	219,9	727,9	Vrućica sa zimicom	0
11	37	43,51	33,7	Dobroćudna novotvorina/Cista u području lijevog jajnika	0
12	65	703,9	261,1	Zloćudna novotvorina istmusa uterusa	1
13	32	163,3	109,5	Zloćudna novotvorina endocerviksa	1
14	33	25,49	57,81	Endometrioza	0
15	33	39,19	46,99	Cista jajnika	0
16	50	7,09	47,95	Zdrava žena	0
17	80	10,23	50,26	Zloćudna novotvorina glavnog bronha	1
18	21	15,07	44,38	Dobroćudna novotvorina vezivnog i ostalih mekih tkiva zdjelice	0
19	60	14,38	44,75	Folikularna cista jajnika	0
20	80	187,3	137,8	Zloćudna novotvorina glavnog bronha	1
21	60	50,81	171,3	Dispneja	0
22	43	9,43	52,09	Cista jajnika	0
23	29	203	39,3	Endometrioza	0
24	80	3511	149,3	Zloćudna novotvorina glavnog bronha	1
25	64	47,49	113,1	Zloćudna novotvorina miometrija	1
26	72	52,47	121,8	Zloćudna novotvorina glavnog bronha	1
27	53	6383	135,9	Zloćudna novotvorina jajnika	1
28	84	561,1	191,6	Pleuralni izljev sa stanjima svrstanim drugamo	1

29	68	942,3	373,6	Kontrolni pregled nakon nespecificiranog liječenja zloćudne novotvorine	1
30	63	88,64	203	Dobroćudna novotvorina retroperitoneja	0
31	68	957,5	198,6	Zloćudna novotvorina jajnika	1
32	54	46,17	58,39	Zloćudna novotvorina jajnika	1
33	60	176,5	72,1	Ostale i nespecificirane bolesti jetre	0
34	75	37,9	235,5	Multipli mijelom	1
35	54	52,09	94,58	Zloćudna novotvorina jajnika	1
36	73	72,08	270,7	Zloćudna novotvorina jajnika	1
37	60	2906	>1500	Zloćudna novotvorina istmusa uterusa	1
38	58	40,85	64,3	Respiracijska insuficijencija, nespecificirana	0
39	65	130,2	100,6	Zloćudna novotvorina glavnog bronha	1
40	75	288,4	102,3	Akutni abdomen	0
41	55	117,9	54	Zloćudna novotvorina jajnika	1
42	69	3393	>1500	Zloćudna novotvorina bez specificiranog sijela	1
43	79	115,2	217,4	Promatranje zbog sumnje na tuberkulozu	0
44	74	862,8	>1500	Terminalna bubrežna bolest/Zloćudna novotvorina dojke/kreatinin 837umol/L	1
45	77	77	130,7	Zloćudna novotvorina ostalih i nedovoljno definiranih probavnih organa	1
46	56	113,8	402,2	Zloćudna novotvorina egzocerviksa	1
47	59	712,6	397,5	Sekundarna zloćudna novotvorina pluća	1
48	62	500,5	1398	Zloćudna novotvorina jajnika	1
49	65	759,6	386,9	Zloćudna novotvorina istmusa uterusa	1
50	37	68,08	59,1	Folikularna cista jajnika	0
51	60	427,6	846,5	Zloćudna novotvorina jajnika	1
52	57	50,02	308	Zloćudna novotvorina jajnika	1
53	63	37,83	61,25	Zloćudna novotvorina bradavice i areole	1
54	57	54,41	49,33	Zloćudna novotvorina bradavice i areole	1
55	60	8277	1254	Zloćudna novotvorina jajnika	1
56	83	43,7	120,3	Akutni abdomen	0
57	43	38,94	69,79	Zloćudna novotvorina jajnika	1
58	29	229,6	38,77	Novotvorina nesigurne ili nepoznate prirode posteljice	1
59	55	55,59	39,25	Zloćudna novotvorina jajnika	1

60	52	>5000	1999	Zloćudna novotvorina jajnika	1
61	79	1856	542,1	Zloćudna novotvorina jajnika	1
62	69	74,22	57,19	Zloćudna novotvorina jajnika	1
63	56	60,48	49,73	Zloćudna novotvorina antruma pilorusa	1
64	51	49,54	207,7	Zloćudna novotvorina tijela gušterače	1
65	58	52,13	60,87	Zloćudna novotvorina jajnika	1
66	68	147,6	120,9	Zloćudna novotvorina želuca, nespecificiranog	1
67	70	44,9	703,4	Zloćudna novotvorina cekuma	1
68	75	36,03	114,6	Dobroćudna novotvorina jajnika	0
69	36	118,3	41,4	Stečena atrofija jajnika i jajovoda	0
70	68	73,48	240,5	Sistemske poremećaji vezivnog tkiva	0
71	57	72,15	44,01	Zloćudna novotvorina jajnika	1
72	42	319,4	156,5	Zloćudna novotvorina jajnika	1
73	77	49,84	104,7	Zloćudna novotvorina završnog debelog crijeva	1
74	25	44,4	41,48	Endometrioza retrovaginalnog septuma i vagine	0
75	66	22,48	55,31	Druga osteoporoza	0
76	58	62,75	11,2	Zloćudna novotvorina jajnika	1
77	66	22,48	55,31	Druga osteoporoza	0
78	85	22,41	188,3	Esencijalna hipertenzija	0
79	39	64,97	45,92	Submukozni leiomiom maternice	0
80	38	56,55	70,84	Endometrioza	0

NORMALNIH	15	44	28
PATOLOŠKIH	65	36	52
	80	80	80

MALIGNA BOLEST : zloćudna novotvorina jajnika, uterusa, cerviksa, glavnog bronha,
bradavice

BENIGNA BOLEST : endometrioza, cista jajnika, dobroćudna novotvorina
jajnika, lejomiom

Legenda: *0 = pacijentice s benignom bolešću*

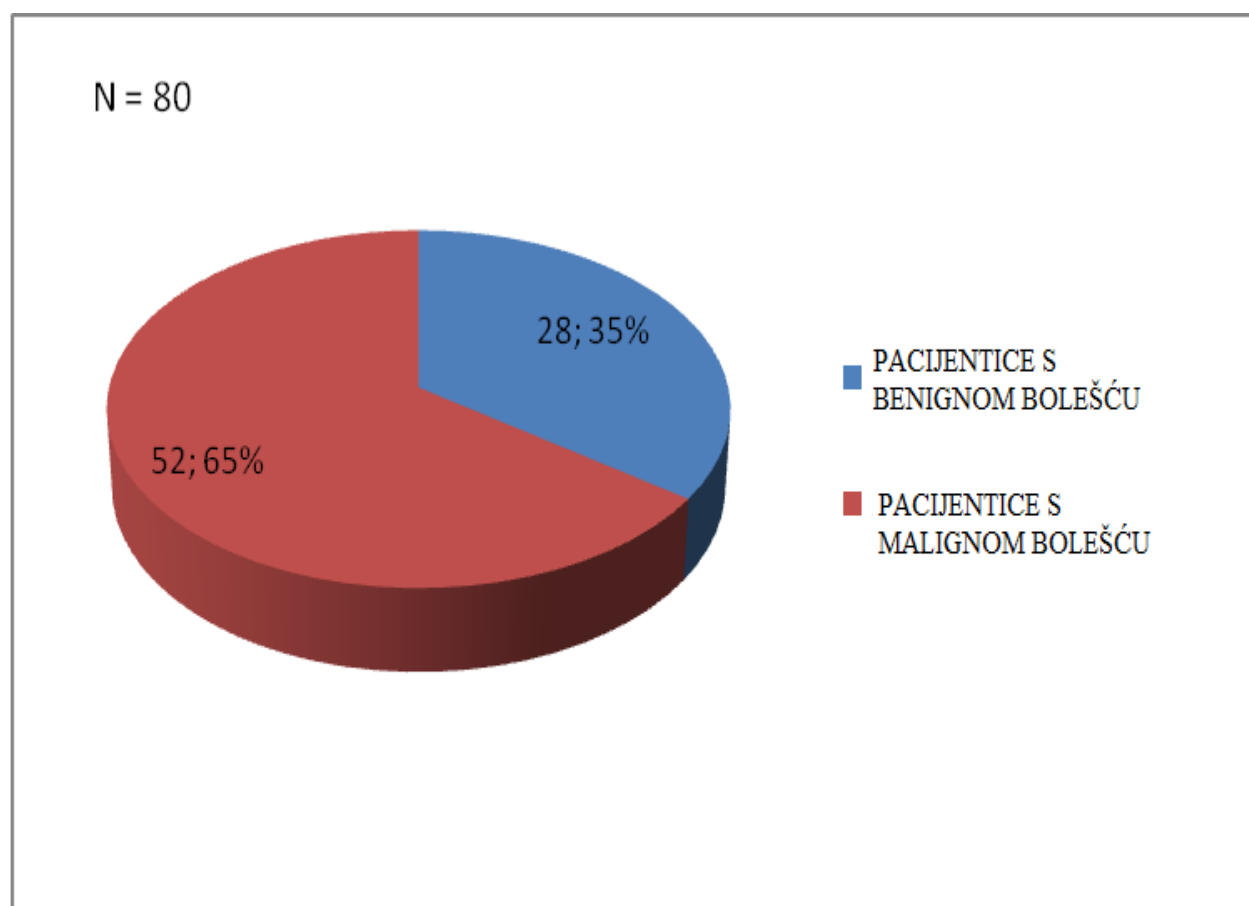
1 = pacijentice s malignom bolešću

rezultati obojeni crno = do granične vrijednosti

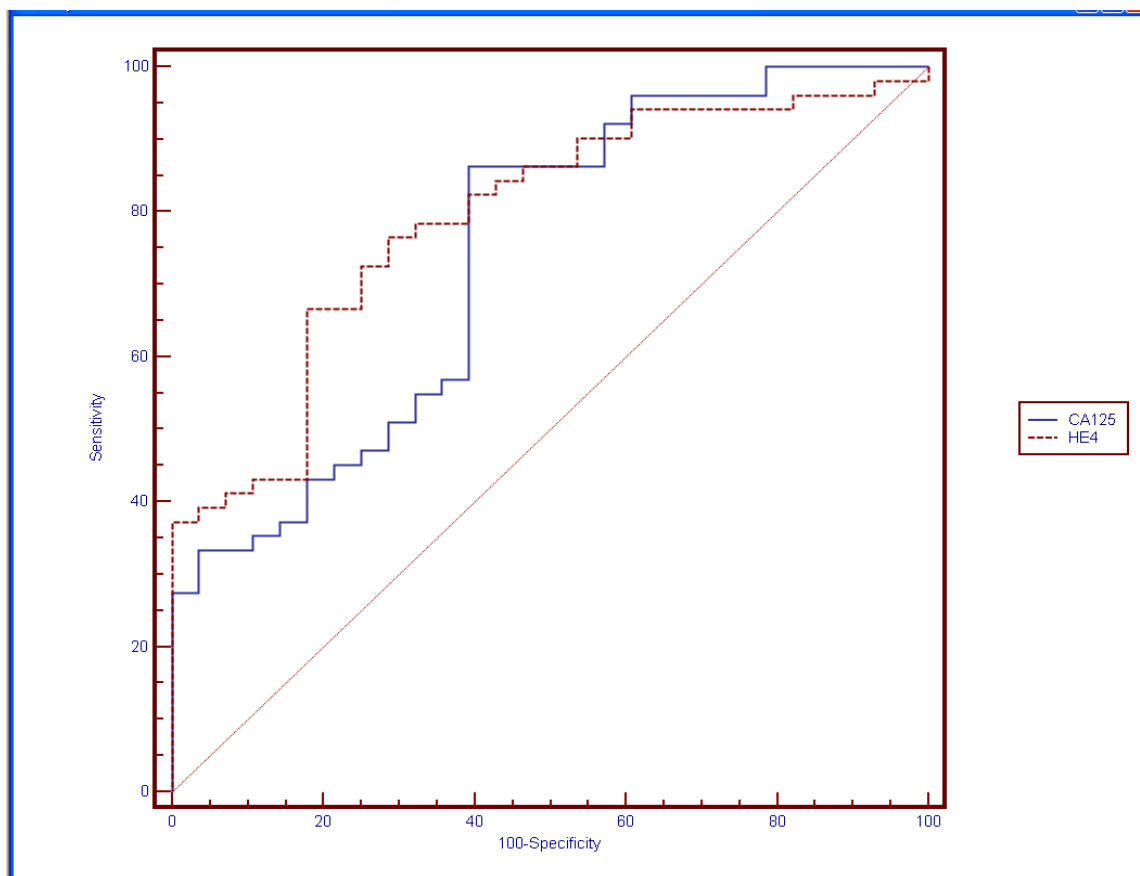
rezultati obojeni crveno = iznad granične vrijednosti

granične vrijednosti: CA125 < 35 kIU/L

HE4 < 140 pmol/L



Slika 11. Podjela pacijentica u dvije skupine



Slika 12. Usporedba krivulja ROC za CA125 i HE4

(slika preuzeta i preoblikovana iz statističkoga programa MedCalc v9.3.2.0

(omogućio:KZLD))

4.2. RASPRAVA

Određena je vrijednost biljega HE4 i CA125 u 80 bolesnica s medijanom dobi 60 godina (21-85). Rezultati su obrađeni u statističkom programu MedCalc v9.3.2.0 (omogućio:KZLD) i prikazani Box .Whisker grafom. (Slika 11)

Graf nam pokazuje da podatci nisu normalno raspodijeljeni jer je najviše pacijentica na 60 godina. Naime, svaki kvadratić predstavlja jednu osobu. Program je izbacio četiri pacijentice čija dob previše odskake od sredine. Zeleni kvadrat na grafu je interval pouzdanosti. On označava 95%-tnu vjerojatnost da su pacijentice između 53 i 69 godina. Osim interkvartilnim rasponom, nenormalnu raspodjelu podataka možemo prikazati i medijanom. Medijan vrijednosti CA125 bio je 64,5 kIU/L (7,09-8277), dok je medijan vrijednosti HE4 bio 117,4 pmol/L (11,2-1999).

Cilj nam je bio procijeniti dijagnostičku točnost pretrage HE4 odnosno koliko dobro HE4 i CA125 razlikuju maligna od benignih ginekoloških oboljenja. Bolesnice su podijeljene u dvije skupine. Jednu su skupinu činile bolesnice s benignim oboljenjima kao što su endometrioza, cista jajnika, dobroćudna novotvorina jajnika, lejomiom i njih je bilo 28, a u drugoj skupini su bile 52 bolesnice s malignim ginekološkim oboljenjem poput zloćudne novotvorine jajnika, uterusa, cerviksa i dojke. (Slika 12)

Kako bi saznali razlikuje li HE4 bolje nego CA125 pacijentice s benignom bolešću od pacijentica s malignom bolešću, odredili smo koncentracije HE4 i CA125 u serumu. Prema dobivenim koncentracijama CA125 (65 patoloških) i HE4 (36 patoloških) (navedene u tablici 5) više je patoloških bilo kod CA125 što upućuje na velik broj lažno pozitivnih vrijednosti CA125.

Kod zloćudnih bolesti očekuju se povišene koncentracije i CA125 i HE4, a kod dobroćudnih bolesti, vrijednosti ispod graničnih. Kako je CA125 slabe dijagnostičke osjetljivosti, često neće biti povišen kod karcinoma u stadiju 1 ili 2 dok će HE4 tada biti povišen i upućivat će na karcinom. Primjer su pacijentice pod rednim brojevima 5 i 7 koje imaju sarkom maternice u stadiju 1 te zloćudnu novotvorinu jajnika, a koncentracije CA125 su ispod graničnih vrijednosti. Pacijentice pod rednim brojem 11, 15, 50, 68 imaju povišen CA125,a dobroćudnu bolest (cistu na jajniku). Kod endometrioze su povišene koncentracije CA125 u serumu dok HE4 nije povišen u endometriozi. (pacijentice 23, 74, 80)

Dijagnostička točnost izražava se mjerama dijagnostičke točnosti. U obradi naših rezultata, od mjera dijagnostičke točnosti, koristili smo osjetljivost i specifičnost te površinu ispod krivulje ROC. Krivulja ROC najbolja je za razlikovanje dvaju stanja. Po obliku krivulje ROC i površini ispod nje AUC možemo procijeniti kolika je učinkovitost pretrage, odnosno kolika je sposobnost testa da razlikuje zdrave od bolesnih. Površinu ispod krivulje ROC odredili smo pomoću statističkih testova kojima procjenjujemo značajnost razlike između dvije AUC.

Odredili smo dijagnostičku točnost prema tablici 4, prema kojoj je naša dijagnostička točnost dobra. U našem slučaju, iako je površina ispod ROC krivulje za HE4 (AUC 0,790) veća od površine ispod ROC krivulje za CA125 (AUC 0,739), razlika u AUC nije statistički značajna ($p=0,410$) jer je $p > 0,05$. Statistički značajna razlika je kada je $p < 0,05$.

Prema Parku i suradnicima, vrijednosti AUC za kombinaciju oba biljega nisu ništa više nego vrijednosti AUC za svaki pojedini biomarker, a takav je rezultat i našega istraživanja.

Bandiera i suradnici dokazali su visoku specifičnost HE4 u dijagnostici i razlikovanju benignih od malignih bolesti, te da je HE4 manje povišen kod pacijentica s benignim cistama ili endometriozom što prikazuju i naši rezultati.

Osjetljivost i specifičnost se mijenjaju s izborom granične vrijednosti pa za svaku pojedinu graničnu vrijednost postoji par dijagnostičke osjetljivosti i specifičnosti. Kod granične vrijednosti CA125 (35 kIU/L) dobivena je osjetljivost od 92% uz specifičnost 43%, dok je za HE4 uz graničnu vrijednost od 140 pmol/L dobivena osjetljivost 53% i specifičnost od 82%. Dakle, na ispitivanoj populaciji je CA125 biljeg veće osjetljivosti, a HE4 biljeg veće specifičnosti.

Dok su Simmons i suradnici, dobili da je HE4 biljeg veće osjetljivosti od CA125 te da je pomoću HE4 lakše detektirati rani stadij karcinoma jajnika.

Ovo je istraživanje pokazalo da je granična vrijednost kod koje bi najbolje mogli razlikovati zdrave od bolesnih (u našem slučaju bolesnice s benignom bolešću od onih s malignom bolešću) odnosno ona granična vrijednost kod koje nam je najbolja (optimalna) specifičnost i osjetljivost, 44 kIU/L za CA125 pri kojoj nam je osjetljivost 86%, a specifičnost 60%, a idealna granična vrijednost za HE4 je 120 pmol/L kada je osjetljivost 66%, a specifičnost 82%.

5. ZAKLJUČAK

Većina TB ima nedovoljnu osjetljivost i specifičnost što onemogućava da se koriste u ranoj detekciji karcinoma. Neki od njih se mogu koristiti za ranu dijagnozu kod visoko-rizičnih skupina i u probiru. Do sada je CA125 bio najučinkovitiji biljeg u laboratorijskoj obradi bolesnica s karcinoma jajnika, dok se nije otkrio novi biljeg, HE4.

Rezultati ovog ispitivanja većinom su u skladu s aktualnim literaturnim podacima. Iako je AUC za HE4 veći od CA125, pokazano je da to nije statistički značajno. Rezultati su pokazali da bi trebali pomaknuti graničnu vrijednost CA125 sa 35 kIU/L na 44 kIU/L jer je ona optimalna, a graničnu vrijednost HE4 sa 140 pmol/L na 120 pmol/L.

Budući da se na ispitivanoj populaciji CA125 pokazao biljegom veće osjetljivosti, a HE4 veće specifičnosti u dijagnostici ginekoloških malignih bolesti, osobito karcinoma jajnika, optimalna dijagnostička vrijednost postigla bi se istovremenim određivanjem oba ispitivana biljega. Kombinacija ova 2 biljega omogućuje preciznu dijagnozu u žena s tvorevinama unutar zdjelice, i raniju dijagnozu, kada je tumor u stadijima 1 ili 2.

6. LITERATURA

Andersen MR, Goff BA, Lowe KA, Scholler N, Bergan L, Drescher CW, Paley P, Urban N. Use of a Symptom Indeks, CA125, and HE4 to predict ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 2010, 116, 378-383.

Bandiera E, Romani C, Specchia C, Zanotti L, Galli C, Ruggeri G, Tognon G, Bignotti E, Tassi RA, Odicino F, Caimi L, Sartori E, Santin AD, Pecorelli S, Ravaggi A. Serum human epididymis protein 4 (HE4) and Risk for Ovarian Malignancy Algorithm (ROMA) as new diagnostic and prognostic tools for epithelial ovarian cancer management. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2011, 20, 2496-2506.

Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. Fifth edition. St. Louis, SAD, Elsevier, 2012, str. 642- 644., 1952.

Chan DW, Bast Jr. RC, Shih I-M, Sokoll LJ, Sölétormos G. Tumor Markers in Ovarian Cancer. U: Laboratory Medicine Practice Guidelines. Use of Tumor Markers in Testicular, Prostate, Colorectal, Breast, and Ovarian Cancers. Sturgeon CM, Diamandis E, urednici, Washington,DC, *Clin Chem*, 2009, str. 55-56.

Čepelak I, Štraus B, Dodig S, Labar B. Medicinsko – biokemijske smjernice. Zagreb, Medicinska naklada, 2004, str. 105.

Ferraro S, Schiumarini D, Panteghini M. Human epididymis protein 4: Factors of variation. *Clin Chim Acta*, 2015, 438, 171-177.

Genomske promjene i karcinogeneza, 1995., <http://www.klinkemija.kbcm.hr>, pristupljeno 29.5.2015.

Imunobiologija tumora, 2010., <http://www.perpetuum-lab.com.hr>, pristupljeno 12.6.2015

Kappelmayer J, Antal-Szalmás P, Nagy Jr. B. Human epididymis protein 4 (HE4) in laboratory medicine and an algorithm in renal disorders. *Clin Chim Acta*, 2015, 438, 35-42.

Kujundžić M i suradnici. Klinička patofiziologija za studente Farmaceutsko- biokemijskog fakulteta. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Zagreb, 2003, str. 300.

Li J, Dowdy S, Tipton T, Podratz K, Lu W-G, Xie X, Jiang S-W. HE4 as a biomarker for ovarian and endometrial cancer management. *Expert Rev Mol Diagn*, 2009, 9, 555-566.

Lin JY, Qin JB, Sangvatanakul V. Human epididymis protein 4 for differential diagnosis between benign gynecologic disease and ovarian cancer: a systematic review and meta – analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 167, 2013, 81-85.

Lothar T. Clinical Laboratory Diagnostics. Frankfurt/ Main, TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, 1998. str. 938.

Molina R,Xavier F, Augé JM, Escudero JM. Clinical value of tumor markers. Switzerland, Roche Diagnostics Ltd., 2011, str.1, 14, 15, 20-23,46, 51-62, 65, 66, 134, 148, 149

Moore RG, Miller MC, Eklund EE. Serum levels of the ovarian cancer biomarker HE4 are decreased in pregnancy and increase with age. *Am J Obstet Gynecol*, 2012a, 349,e1-7.

Moore RG, Miller MC, Steinhoff MM. Serum HE4 levels are less frequently elevated than CA125 in women with benign gynecologic disorders. *Am J Obstet Gynecol*, 2012b,351,e1-8.

Park Y, Lee J-H, Hong DJ, Lee EY, Kim H-S. Diagnostic performances of HE4 and CA125 for the detection of ovarian cancer from patients with various gynecologic and non-gynecologic diseases. *CLB*, 2011, 44, 884-888.

Povjerenstvo za stručna pitanja, 2005., <http://www.hkmb.hr> , pristupljeno 4.7.2015.

Roche Diagnostics. CA125 II, Cancer Antigen 125. Mannheim, 2011.

Roche Diagnostics. HE4, Human epididymal protein 4. Mannheim, 2013a

Roche Diagnostics. HE4 – Human Epididymal Protein 4. A novel oncological biomarker improving ovarian cancer care.. Switzerland, 2013b

Sertić J i suradnici. Klinička kemija i molekularna dijagnostika. Zagreb, Medicinska naklada, 2008, str. 133-141.

Simmons AR, Baggerly K, Bast Jr RC. The Emerging Role of HE4 in the Evaluation of Advanced Epithelial Ovarian and Endometrial Carcinomas. *Oncology (Williston Park)*, 2013, 27, 548-556.

Sturgeon CM i Diamandis EP. Use of tumor markers in clinical practice: Quality requirements, Washington, DC, AACC, 2009, str. 13.

Šamija M, Vrdoljak E, Krajina Z. Klinička onkologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2006, str. 87-88.

Šimundić A-M. Osnove biostatistike u svakodnevnoj praksi. Zagreb, Medicinska naklada, 2008, str. 5,10,66,69.

Štraus B, Rumora L. Biokemija i dijagnostika zloćudnih tumora. U: Štrausova Medicinska biokemija. Čvorišćec D, Čepelak I, urednice, Zagreb, Medicinska naklada, 2009, str. 517-533.

Topić E, Primorac D, Janković S. Medicinskobiokemijska dijagnostika u kliničkoj praksi. Zagreb, Medicinska naklada, 2004, str. 318 -319.

Vrdoljak E, Šamija M, Kusić Z, Petković M, Gugić D, Krajina Z. Klinička onkologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2013, str.172., 174.–177., 179.

7. SAŽETAK

Karcinom jajnika druga je najčešća maligna bolest i vodeći uzrok smrti od karcinoma u žena. Petogodišnje preživljenje kod epitelnog karcinoma jajnika otkrivenog u FIGO stadiju I je 90%. Danas se <30% karcinoma jajnika dijagnosticira u FIGO stadiju I ili II. CA125, do nedavno jedini tumorski biljeg u laboratorijskoj dijagnostici karcinoma jajnika, nedovoljne je dijagnostičke specifičnosti i osjetljivosti. S ciljem poboljšanja dijagnostike karcinoma jajnika ispitivano je nekoliko različitih proteina. Obećavajuće rezultate dao je sekretorni glikoprotein HE4 (eng. human epididymal protein 4).

Cilj ovog rada je ispitati dijagnostičku vrijednost biljega HE4 kod bolesnica upućenih na određivanje CA125 u KBC Zagreb. Određena je vrijednost biljega HE4 i CA125 u 80 bolesnica s medijanom dobi 60 godina (21-85), elektrokemiluminiscentnom metodom na analizatoru Cobas 6000cee (ECLIA, Roche Diagnostics). Rezultati su obrađeni u statističkom programu MedCalc v9.3.2.0 (omogućio: KZLD).

Bolesnice su podijeljene u dvije skupine. Jednu su skupinu činile bolesnice s benignim oboljenjima (N=28): endometrioza, cista jajnika, dobroćudna novotvorina jajnika, lejomiom, a drugu bolesnice s malignim ginekološkim oboljenjem (N=52): zloćudna novotvorina jajnika, uterusa, cerviksa i dojke. Medijan vrijednosti CA125 bio je 64,5 kIU/L (7,09-8277), dok je medijan vrijednosti HE4 bio 117,4 pmol/L (11,2-1999).

Iako je površina ispod ROC krivulje za HE4 (AUC 0,790) veća od površine ispod ROC krivulje za CA125 (AUC 0,739), razlika u AUC nije statistički značajna ($p=0,410$). Kod granične vrijednosti CA125 (35 kIU/L) dobivena je osjetljivost od 92% uz specifičnost 43%, dok je za HE4 uz graničnu vrijednost od 140 pmol/L dobivena osjetljivost 53% i specifičnost od 82%.

Rezultati ovog ispitivanja većinom su u skladu s aktualnim literaturnim podacima. Budući da se na ispitivanoj populaciji CA125 pokazao biljegom veće osjetljivosti, a HE4 veće specifičnosti u dijagnostici ginekoloških malignih bolesti, osobito karcinoma jajnika, optimalna dijagnostička vrijednost postigla bi se istovremenim određivanjem oba ispitivana biljega.

8. SUMMARY

Ovarian cancer is second most common malignancy and leading cause of cancer death in women. Five-year survival in epithelial ovarian cancer detected in FIGO stage I is 90%. Today, <30% ovarian cancer are diagnosed in FIGO stage I or II. CA125, recently the only tumor marker in diagnostics of ovarian cancer, has insufficient diagnostic specificity and sensitivity. Several different proteins are investigated to improve diagnostics of ovarian cancer. Promising results gave secretory glycoprotein HE4.

The aim of this study was to examine the diagnostic value of HE4 in patients referred to KBC Zagreb for determination of CA125. HE4 and CA125 markers were determined in 80 patients with median age 60(21-85) by electrochemiluminescent method on Cobas 6000cee (ECLIA,Roche Diagnostics). Results were analyzed using statistical program MedCalc v9.3.2.0 (licensed:KZLD).

Patients were divided into two groups. Patients with benign diseases (n = 28): endometriosis, ovarian cysts, benign ovarian neoplasm, leiomyoma, and patients with malignant gynecological diseases (n = 52): malignant ovarian, uterus, cervix and breast neoplasm. The median value CA125 was 64.5 kIU/L(7.09 to 8277), while the median value HE4 was 117.4 pmol/L (11.2 to 1999).

Although the area under the ROC curve for HE4(AUC 0.790) was larger than the area under the ROC curve for CA125(AUC 0.739) the difference in AUCs was not statistically significant ($p = 0.410$). The CA125 sensitivity of 92% and specificity of 43% was obtained by cutt off 35 KIU/L while for HE4 sensitivity was 53% and specificity 82% by cutt off 140 pmol/L.

Results of this study are mostly consistent with the current literature data. Since, on studied population, CA125 has been shown as a marker of greater sensitivity and HE4 greater specificity in the diagnosis of gynecological malignancies, particularly ovarian cancer, the optimal diagnostic value would be achieved by simultaneously determining both studied markers.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za laboratorijsku dijagnostiku
Kišpatićeva 12, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

DIJAGNOSTIČKA VRIJEDNOST TUMORSKOG BILJEGA HE4 U DIFERENCIJALNOJ DIJAGNOSTICI GINEKOLOŠKIH OBOLJENJA

Mateja Troha

SAŽETAK

Karcinom jajnika druga je najčešća maligna bolest i vodeći uzrok smrti od karcinoma u žena. CA125, do nedavno jedini tumorski biljeg u laboratorijskoj dijagnostici karcinoma jajnika, nedovoljne je dijagnostičke specifičnosti i osjetljivosti. S ciljem poboljšanja dijagnostike karcinoma jajnika ispitivano je nekoliko različitih proteina. Obećavajuće rezultate dao je sekretorni glikoprotein HE4 (eng. human epididymal protein 4). Cilj ovog rada je ispitati dijagnostičku vrijednost biljega HE4 kod bolesnica upućenih na određivanje CA125 u KBC Zagreb. Određena je vrijednost biljega HE4 i CA125 u 80 bolesnica s medijanom dobi 60 godina (21-85), elektrokemiluminiscentnom metodom na analizatoru Cobas 6000cee (ECLIA, Roche Diagnostics). Bolesnice su podijeljene u dvije skupine. Jednu su skupinu činile bolesnice s benignim oboljenjima (N=28): endometrioza, cista jajnika, dobroćudna novotvorina jajnika, lejomiom, a drugu bolesnice s malignim ginekološkim oboljenjem (N=52): zloćudna novotvorina jajnika, uterus, cerviksa i dojke. Iako je površina ispod ROC krivulje za HE4 (AUC 0,790) veća od površine ispod ROC krivulje za CA125 (AUC 0,739), razlika u AUC nije statistički značajna ($p=0,410$). Kod granične vrijednosti CA125 (35 kIU/L) dobivena je osjetljivost od 92% uz specifičnost 43%, dok je za HE4 uz graničnu vrijednost od 140 pmol/L dobivena osjetljivost 53% i specifičnost od 82%. Rezultati ovog ispitivanja većinom su u skladu s aktualnim literaturnim podacima. Budući da se na ispitivanoj populaciji CA125 pokazao biljegom veće osjetljivosti, a HE4 veće specifičnosti u dijagnostici ginekoloških malignih bolesti, osobito karcinoma jajnika, optimalna dijagnostička vrijednost postigla bi se istovremenim određivanjem oba ispitivana biljega.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 49 stranica, 12 grafičkih prikaza, 5 tablica i 29 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Tumor, tumorski biljeg, CA125, HE4, dijagnostička osjetljivost, dijagnostička specifičnost, karcinom jajnika, ROC krivulja

Mentor: **Dr. sc. Dunja Rogić**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Dunja Rogić**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Nada Vrkić, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Anita Somborac Bačura, viša asistentica – znanstvena novakinja Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: srpanj 2015.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Laboratory Medicine
Kišpatićeva 12, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

THE DIAGNOSTIC VALUE OF TUMOR MARKER HE4 IN THE DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF GYNECOLOGICAL DISEASES

Mateja Troha

SUMMARY

Ovarian cancer is second most common malignancy and leading cause of cancer death in women. CA125, recently the only tumor marker in diagnostics of ovarian cancer, has insufficient diagnostic specificity and sensitivity. Several different proteins are investigated to improve diagnostics of ovarian cancer. Promising results gave secretory glycoprotein HE4. The aim of this study was to examine the diagnostic value of HE4 in patients referred to KBC Zagreb for determination of CA125. HE4 and CA125 markers were determined in 80 patients with median age 60(21-85) by electrochemiluminescent method on Cobas 6000cee (ECLIA,Roche Diagnostics). Patients were divided into two groups. Patients with benign diseases (n = 28): endometriosis, ovarian cysts, benign ovarian neoplasm, leiomyoma, and patients with malignant gynecological diseases (n = 52): malignant ovarian, uterus, cervix and breast neoplasm. Although the area under the ROC curve for HE4(AUC 0.790) was larger than the area under the ROC curve for CA125(AUC 0.739) the difference in AUCs was not statistically significant (p = 0.410). The CA125 sensitivity of 92% and specificity of 43% was obtained by cut off 35 kIU/L while for HE4 sensitivity was 53% and specificity 82% by cut off 140 pmol/L. Results of this study are mostly consistent with the current literature data. Since, on studied population, CA125 has been shown as a marker of greater sensitivity and HE4 greater specificity in the diagnosis of gynecological malignancies, particularly ovarian cancer, the optimal diagnostic value would be achieved by simultaneously determining both studied markers.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 49 pages, 12 figures, 5 tables and 29 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Tumor, tumor marker, CA 125, HE4, diagnostic sensitivity, diagnostic specificity, ovarian cancer, ROC curve

Mentor: **Dunja Rogić, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Dunja Rogić, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Nada Vrkić, Ph.D. *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Anita Somborac Bačura, Ph.D. *Senior Assistant*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2015.